# Versuche zur Konservierung von Augenarzneien durch oligodynamisch wirksame Silbermengen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps – Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

Ursula Krause

aus Breslau

Marburg 1978

Druck: A. Sonnenburg, Trier

# VERSUCHE ZUR KONSERVIERUNG VON AUGENARZNEIEN DURCH OLIGODYNAMISCH WIRKSAME SILBERMENGEN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps - Universität Marburg / Lahn

vorgelegt von

URSULA KRAUSE

aus Breslau

Marburg 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie der
Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am: 12.7. 1978
Tag der mündlichen Prüfung: 12.7. 1978

Berichterstatter: Prof. Dr. P.H. List
Mitberichterstatter: Prof. D. W. Schiff

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. P. H. List

an der staatlichen Lehranstalt für Pharmazeutisch-technische Assistenten in Trier angefertigt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. P. H. List, bin ich für sein stets wohlwollendes Interesse an den Problemen meiner Arbeit und seine mir bei zahlreichen Diskussionen aus einem reichen Erfahrungsschatz entgegengebrachten sachkundigen Anregungen und Hinweise sowie für die wohlgemeinten Korrekturen zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Ebenso gilt mein Dank den Verantwortlichen der Bezirksregierung und der PTA - Lehhranstalt Trier für ihre großzügige Unterstützung durch die Überlassung von Gerätschaften und Räumlichkeiten zur Durchführung der experimentellen Arbeiten.
Meinen Mitarbeitern danke ich für ihre Geduld.

Für die Förderung dieser Arbeit danke ich nicht zuletzt folgenden Personen und Institutionen:

Herrn Dr. Krüger und seinen Mitarbeitern, Boehringer-Mannheim, für die Aufenthalte in den mikrobiologischen Untersuchungslaboratorien sowie für die fachliche und materielle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. W. Schiff, Marburg, für seine Anregungen.

Herrn Dr. Reinfurt vom Medizinaluntersuchungsamt Trier für die Unterstützung bei der Keimidentifizierung.

den Herren Dr. Franzen und Waligorski vom chemischen Untersuchungsamt Trier für Atomabsorptionsbestimmungen.

der Firma Stella, Niederwalluf, für die Überlassung von Mustern der Augentropfflaschen.

Herrn Fecher, Marburg, für die Durchführung der REM-Aufnahmen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0023

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsübersicht Seite


A ALLGEMEINER TEIL

1 Überlegungen zur Problematik der Konservierung flüssiger Augenarzneien 1

2 Flüssige Augenarzneien aus mikrobiologischer Sicht - Richtlinien und Empfehlungen - 2

2.1 Kontaminanten in Augenarzneien 2
2.2 Konservierungsmittel in Augentropfen 3
2.2.1 Definition 3
2.2.2 Allgemeine Anforderungen an Konservierungsmittel für Augenarzneien 4
2.2.3 Antimikrobielle Wirksamkeit von Konservierungsmitteln für Augentropfen 5
2.2.3.1 Prüfungsvorschriften und Forderungen nach ausreichender Konservierung (Mikrobiologischer Belastungstest) 7
2.2.3.2 Prüfungsberichte zur Wirksamkeit der wichtigsten Konservierungsmittel am Auge 11
2.2.4 Physiologische Verträglichkeit von Konservierungsmitteln am Auge 14

3 Der oligodynamische Effekt von Schwermetallen 16

3.1 Zur Pharmakologie von Silber 16
3.2 Historisches zur oligodynamischen Wirkung von Silber 17
3.2.1 Technische Verfahren zur Keimreduktion von Wasser durch Silber 20
3.3 Silberverluste aus der Lösung durch Adsorbentien 21
3.3.1 Wandadsorption 21
3.3.2 Adsorption an Mikroorganismen 21
3.3.3 Verwendung schwer löslicher Silbersalze 22
3.4 Die antimikrobielle Eigenschaft von Silbersalzen 24

| | | |
|---|---|---|
| 3.4.1 | Keimtötungseffekt gegenüber Bakterien | 24 |
| 3.4.2 | Keimtötungseffekt gegenüber Pilzen, Hefen, Sporen | 24 |
| 3.4.3 | Die Höhe der Keimeinsaat | 24 |
| 3.5 | Faktoren, welche die oligodynamische Wirkung von Silber beeinflussen | 25 |
| 3.5.1 | Die Silberionenkonzentration | 25 |
| 3.5.2 | In der Lösung vorhandene Elektrolyte | 26 |
| 3.5.2.1 | Hemmung der antimikrobiellen Wirksamkeit | 26 |
| 3.5.2.2 | Vollständige Aufhebung der antimikrobiellen Wirksamkeit | 27 |
| 3.5.2.3 | Steigerung der antimikrobiellen Wirksamkeit | 27 |
| 3.5.3 | Organische Substanzen und Makromoleküle | 27 |
| 3.5.4 | Die Temperatur, der pH-Wert der Lösung | 27 |
| 3.5.5 | Die Einwirkungszeit des Silbers | 28 |
| 3.6 | Kritik an den mikrobiologischen Prüfungsmethoden | 28 |
| 3.7 | Der antimikrobielle Wirkungsmechanismus von Silber in ppb-Mengen | 28 |
| 3.7.1 | Antibakterieller Wirkungsmechanismus von Schwermetallen | 29 |
| 3.7.2 | Adsorption von Silber an die Bakterienzellwand | 29 |
| 3.7.3 | Bakterizide und bakteriostatische Silberwirkung | 30 |
| 3.7.4 | Bindung von Silber an mikrobielle Zellproteine und Nucleinsäure, insbesondere an DNA | 31 |
| 3.7.4.1 | Die Interkalation von Actinomycin und Platin: ein Vergleich mit Silber | 34 |

Seite


3.7.5 Blockierung von Zellfermenten durch Silber 34
3.7.6 Zusammenfassung 35
3.8 Silberkomplexe mit Proteinen und Aminosäuren 36
3.9 Parallelitäten zwischen dem chemischen und biologischen Verhalten von Silbersalzen 37

B SPEZIELLER TEIL

4 Aufgabenstellung: Auswahl der Verfahren und Methoden 38

4.1 Herstellen von Abgabegefäßen mit antimikrobieller Wirksamkeit 38
4.2 Mikrobiologische Prüfungen nach geltenden Standardmethoden 38
4.3 Silberanalytik im ppb-Bereich 39
4.4 Adsorptions- und Komplexierungsverhalten von Silber 39

5 Silber-Depots in Augentropfgläsern: Material und Methoden 40

5.1 Silberhalogenide: Überzugs- und Fällungsverfahren, Schmelzen 40
5.1.1 Silberchloridstangen ( 1mm x 5mm ) 40
5.1.2 Überzüge aus erstarrten Schmelzen von AgCl und AgBr 40
5.1.3 Glasfritten mit gefälltem Silberchlorid 41
5.2 Silberüberzüge durch Reduktionsversilberung 42
5.2.1 Kunststoffversilberung 42
5.2.1.1 Versilberung der inneren Oberfläche von Polypropylen-Tropfpipetten (STELLA$^{R}$) 43

| | | Seite |
|---|---|---|
| 5.2.2 | Versilberung der Glasgefäße | 45 |
| 5.3 | Zusammenfassung | 45 |
| 6 | **Mikrobiologische Prüfungen** | 47 |
| 6.1 | **Material und Methoden** | 47 |
| 6.1.1 | **Nährmedien** | 47 |
| 6.1.1.1 | **Wachstumskontrollen** | 47 |
| 6.1.2 | **Testkeime** | 47 |
| 6.1.3 | **Keimsuspension** | 48 |
| 6.1.4 | Vorbereitung des Untersuchungsmaterials | 49 |
| 6.1.4.1 | Untersuchung der Substanzen auf antimikrobielle Eigenaktivität | 49 |
| 6.1.4.2 | Ausschalten der antimikrobiellen Eigenaktivität | 49 |
| 6.1.5 | Durchführung der Untersuchungen (Konservierungsmittelbelastungstest) | 50 |
| 6.1.5.1 | Keimgehalt (number of colony-forming units per ml) | 50 |
| 6.1.5.2 | Keimwachstum in flüssigen Nährmedien | 51 |
| 6.1.6 | Prüflösungen | 52 |
| 6.1.6.1 | Herstellung | 52 |
| 6.1.6.2 | Gefäße | 52 |
| 6.1.6.3 | Keimeinsaat | 52 |
| 6.1.6.4 | Lagerung und Kontrolle auf Keimgehalt | 53 |
| 6.1.7 | Minimale Hemmkonzentration von $Ag^+$-Ionen im Suspensionsversuch: Testmethode zur Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln der DGHM - modifiziert nach REYBROUCK | 54 |
| 6.2 | Ergebnisse der mikrobiologischen Prüfungen | 56 |
| 6.2.1 | Silberempfindlichkeit verschiedener Keime: Keimtötende Wirkung von Silberionen (als $AgNO_3$) in verschiedenen Lösungen | 56 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 6.2.1.1 | Suspensionstest der DGHM-modifiziert nach REYBROUCK zur Prüfung der Silberempfindlichkeit (annähernd MHK) | 56 |
| 6.2.1.2 | Absterberate in $AgNO_3$ - Lösungen nach USP XIX (Konservierungsmittelbelastungstest) | 68 |
| 6.2.2 | Konservierungsmittelbelastungstest mit "Silber-Depots" in Augentropfflaschen, geprüft an Hilfsstofflösungen für Augentropfen | 73 |
| 6.2.2.1 | Versilberte Polypropylentropfer (STELLA$^R$) | 73 |
| 6.2.2.2 | Silberchlorid-Fritten | 75 |
| 6.2.2.3 | Silberchlorid- und Silberbromidüberzüge auf Siedesteine (Formlinge aus erstarrten Schmelzen) | 75 |
| | Tabellen und Abbildungen zu 6.2.2 | 76-98 |
| 6.2.3 | Augentropfen des DAC und andere Formulierungen in verschiedenen Testflaschen mit Silber- oder Silberchlorideinlagen | 99 |
| 6.2.3.1 | Wirkstoffhaltige Lösungen, denen Keimsuspensionen verschiedener Stämme einzeln inoculiert wurden | 99 |
| 6.2.3.2 | Wirkstofffreie Lösungen, denen Keimsuspensionen verschiedener Stämme einzeln inoculiert wurden | 102 |
| 6.2.3.3 | Wirkstoffhaltige und wirkstofffreie Lösungen, denen Keimsuspensionen mehrerer Keimarten und Stämme als Mischsuspension inoculiert wurden | 105 |
| | Tabellen und Abbildungen zu 6.2.3 | 108-125 |
| 6.2.4 | Prüfung unkonservierter Augentropfen nach 4-wöchigem Gebrauch auf Kontaminanten | 126 |

Seite

7 Silberanalytik im ppb - Bereich in wässrigen Lösungen 132
7.1 Material und Methoden 132
7.2 Löslichkeit von Silber aus "Silber-Depots" in verschiedenen nicht inoculierten wässrigen Prüflösungen 135
7.2.1 Silberabgabe durch versilberte Augentropfer (STELLA$^R$) an die Prüflösungen 136
7.2.2 Silberabgabe durch Formlinge und Ringe, die mit einer erstarrten Schmelze aus AgCl oder AgBr überzogen wurden, an die Prüflösungen 137
7.2.3 Silberabgabe durch AgCl- imprägnierte Glasfritten an die Prüflösungen 138
7.3 Silbergehalt in verschiedenen inoculierten Prüflösungen nach 1 - 6-monatiger Lagerung 138
7.4 Silberionenverluste aus der Lösung durch Bindung an makromolekulare Hilfsstoffe 145
7.5 Silberadsorption an die Zellmasse von Testkeimen und deren Keimreduktion 147
7.5.1 Adsorption von Silberionen an Bakterien und Cand. alb. aus silberhaltigen Lösungen (Versuchsdurchführung 1) 147
7.5.2 Adsorption von Silberionen aus $AgNO_3$-Lösungen an E. coli ATCC 8739 (Versuchsdurchführung 2) 150
7.5.3 Keramikringe mit erstarrter Silberchloridschmelze Adsorption von Silberionen durch E. coli ATCC 8739 (Versuchsdurchführung 3) 151

8 Zusammenfassung 157

8.1 Beziehung zwischen Keimreduktion und Silberionenkonzentration in der Lösung 157

Seite

8.2 Vergleich der geprüften Silberdepots auf ihre Eignung zur Konservierung von Augentropfen 160

8.3 Eignung von Silber in ppb-Mengen in Form von schwer löslichen Verbindungen zur Konservierung wässriger Augenarzneien aus mikrobiologischer Sicht 162

9 Literaturverzeichnis 169

# A ALLGEMEINER TEIL

## 1 Überlegungen zur Problematik der Konservierung flüssiger Augenarzneien

In der vorliegenden Arbeit wurde nach einer Möglichkeit gesucht, flüssige Ophthalmica in Mehrdosenbehältern ohne Zusatz von Konservierungsmitteln herzustellen und dennoch die nach den Richtlinien moderner Pharmacopoen geforderte Keimfreiheit während des Gebrauchs zu gewährleisten.
Der Zusatz von Konservierungsmitteln in Augenarzneien wird von Seiten der Ophthalmologen häufig kritisiert, da bei keiner der heute verwendeten antimikrobiell wirksamen Substanzen eine absolute Reiz- und Allergisierungsfreiheit gegeben ist.
Die Gefahr der Irritation durch Konservierungsmittel muß insbesondere bei der Anwendung am geschädigten oder entzündeten Auge berücksichtigt werden. Einige Autoren haben bedenkliche Reizungen des Auges durch Konservierungsmittel in Augentropfen beobachtet, wenn Hornhaut oder Conjunctiva bereits vor der Applikation durch entzündliche Prozesse verändert waren (32, 110) (siehe 2.2.4).
Einige Pharmacopoen verbieten aus diesem Grund ausdrücklich die Verwendung von konservierten Augentropfen am verletzten und operierten Auge (USP XIX, Ph. Helv.IV, DAC).
Augenbäder und Augenwässer, welche für die erste Hilfe und eine auf 24 Std. limitierte Anwendung bestimmt sind, sollten nach BPC 73 keine Konservierungsmittel enthalten (85).
Problematisch erscheint ebenfalls die Applikation konservierungsmittelhaltiger Augentropfen für Patienten, die weiche Kontaktlinsen aus Hydroxyethylmethacrylaten (HEMA) tragen, denn sowohl quartäre Ammoniumverbindungen wie auch Organoquecksilbersalze und Chlorhexidinacetat können zu einem erheblichen Teil in den Linsen gespeichert werden und unerwünschte Reizungen am Auge auslösen.
Zuweilen wird dieser Patientengruppe empfohlen, Augentropfen aus Einzeldosenbehältern zu verwenden.

Auch aus Reinigungs- und Aufbewahrungsflüssigkeiten für Kontaktlinsen werden Konservierungsmittel in weichen Linsen angereichert uns verursachen beim Tragen der Linsen Irritationen des Auges, indem sie die Kontaktzeit zwischen Cornea und Konservierungsstoff verlängern ( 17, 80, 85, 94,95 ).
Nicht konservierte flüssige Augenarzneien zur Anwendung am verletzten oder operierten Auge sollten in Einzeldosenbehältern abgegeben werden ( Pharm. Helv.VI, DAC, NF XIII ).
Die Konfektionierung von Augentropfen in Einzeldosenbehältnissen ist für den Apothekenbetrieb, insbesondere bei rezeptualiter hergestellten Augentropfen, wegen des apparativen Aufwandes ungeeignet.
Technologische Probleme ergeben sich darüberhinaus bei der Konfektionierung in Kunststoffgefäßen, da bei der Lagerung mit Konservierungsmittelverlusten als Folge von Absorptions- und Permeationsvorgängen zu rechnen ist.

## 2 Flüssige Augenarzneien aus mikrobiologischer Sicht - Richtlinien und Empfehlungen-

Nach den 1970 publizierten Standards der WHO zur mikrobiologischen Reinheit von Arzneimitteln müssen alle Zubereitungen der Kategorie I, darunter fallen solche zur Anwendung am Auge, steril sein. Diesen Anforderungen schließen sich neben der FDA-Vorschrift von 1972 (28) ebenfalls die Augentropfenmonographien moderner Arzneibücher an (27, 42, 85).
In der Bundesrepublik Deutschland richtet man sich nach dem Deutschen Arzneimittelcodex von 1973 (DAC)[1], der für flüssige Augenarzneien die Abwesenheit von vermehrungsfähigen Keimen vorschreibt.
Über die Gefahren duch infizierte Augenarzneien wird in einer hinreichenden Anzahl von Publikationen berichtet (6a, 42, 61, 85, u.a.).

### 2.1 Kontaminanten in Augenarzneien

Mikrobielle Kontaminationen in Augentropfen werden hauptsächlich duch die nachfolgend aufgeführten Keime verursacht(42,85).

[1] DAC = Ergänzungsbuch zum DAB 7

| Gramnegative Keime | Grampositive Keime |
|---|---|
| Pseudomonas aeruginosa | Staphylococcus aureus |
| Proteus vulgaris | Streptococcus viridans |
| Escherichia coli | Bacillus subtilis |
| Flavobacteriae | Sarcina lutea |
| Aerobacter spec. div. | |
| Alcaligenes | |

Ferner: Pilze (Asperg.fumigatus), Hefen, Adenoviren

Die von einigen Autoren bevorzugte Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen Keimen wird für die hier besprochenen Arzneiformen der Kategorie I als unzweckmäßig angesehen, da alle Keime in Augenarzneien fakultativ pathogen sind (daher die Forderung nach Keimfreiheit).
Der gefährlichste Kontaminant von Augenarzneien ist zweifellos Pseud. aeruginosa. Er wird relativ häufig in mikrobiell verunreinigten Augentropfen gefunden.
Es ist anzunehmen, daß das gesunde Auge gegen den Erreger nicht empfindlich ist, da er in bis zu 7% der Abstriche gesunder Augen nachweisbar ist (110, 42).
Das hohe Penetrationsvermögen von Pseudomonas aeruginosa durch die auch nur gering verletzte Hornhaut ist die Ursache schwerster Augeninfektionen mit sehr häufig einhergehendem Verlust der Sehfähigkeit.

## 2.2 Konservierungsmittel in Augentropfen

### 2.2.1 Definition

Konservieren bedeutet im eigentlichen Sinn des Wortes: "Einen gegebenen Zustand aufrechterhalten".
LINGNAU definiert: "Die Konservierung ist ein physikalischer oder chemischer Vorgang bzw. eine Kombination von beiden und soll Arzneimittel dadurch haltbar und in hygienischer Hinsicht einwandfrei machen, so daß die Vermehrung von Mikro-

organismen verhindert wird."(70).
Für Augenarzneien ist über den mikrobistatischen hinaus ein mikrobizider Effekt des zugesetzten Konservierungsmittels stets erforderlich, um diese Arzneiform auch während des Gebrauchs aus Mehrdosenbehältern keimfrei zu halten.
USP XIX beschreibt unter den Erläuterungen zum Konservierungsmittelbelastungstest - "antimicrobial preservatives effectiviness" - Konservierungsmittel als Substanzen, die Arzneimittel, insbesondere solche in Mehrdosenbehältern, vor Kontaminanten schützen und das Wachstum von Mikroorganismen verhindern sollen. Es wird betont, daß Konservierungsmittel nicht als Ersatz für ein aus hygienischer Sicht sachgerechtes Produktionsverfahren eingesetzt werden dürfen (117).
MULLEN definiert ein Konservierungsmittel für Augenarzneien als "any chemical agent wich prevents the biological degradation of an ophthalmic drug" (76).

### 2.2.2 Allgemeine Anforderungen an Konservierungsmittel für Augentropfen

Nachdem 1973 durch FDA-Verordnung die Konservierung von Augentropfen in Mehrdosenbehältern vorgeschrieben wurde, sind die Diskussionen über die Unbedenklichkeit und Wirksamkeit geeigneter Substanzen nicht abgebrochen.
Die hohen Anforderungen, die aus Gründen der Arzneimittelsicherheit an ein Konservierungsmittel gestellt werden, erfüllt kaum eine der zur Zeit einsatzbereiten Substanzen.
Die an ein "ideales Konservierungsmittel" gestellten Bedingungen sind nachfolgend genannt (3, 5, 76):

1. chemische Verträglichkeit mit den Wirkstoffen
2. keine Beeinträchtigung der pharmakologischen Wirkung
3. weites antimikrobielles Wirkungsspektrum
4. ausreichende Wasserlöslichkeit
5. keine Wirksamkeitsbeeinträchtigung durch den pH-Wert der Formulierung
6. keine Irritation des Auges, keine Toxizität
7. wirksam und stabil nach längerer Lagerung

8. autoklavierbar
9. keine Reaktivität mit dem Behälter
10. wirksam in relativ niedrigen Konzentrationen.

### 2.2.3 Antimikrobielle Wirksamkeit von Konservierungsmitteln für Augenarzneien

Es ist nicht verwunderlich, daß durch die hohen Qualitätsansprüche an Konservierungsmittel für Augenarzneien die Anzahl der verwendbaren Substanzen in den letzten Jahren immer kleiner geworden ist.
Wie bereits erwähnt, müssen Konservierungsmittel in Augenarzneien die Vermehrung von Keimen verhindern. Ihre mikrobizide Wirksamkeit sollte unter anderem an den häufigst gefundenen Kontaminanten geprüft werden.
Um eine vergleichende Aussage über die antimikrobielle Wirksamkeit verschiedener Konservantien für flüssige Augenarzneien machen zu können, müssen die Versuche nach einheitlichen Richtlinien durchgeführt werden. Die Einigkeit der Mikrobiologen in dieser Richtung läßt zu wünschen übrig. Jeder Versuch, aus der vorhandenen Literatur die bakterizide oder fungizide Wirksamkeit der geprüften Konservierungsmittel vergleichend zu beurteilen, muß im Labyrinth der angegebenen oder lückenhaft angegebenen Testverfahren steckenbleiben. Mit nur wenig Übertreibung kann man die Anzahl der unterschiedlichen Prüfungsergebnisse als Funktion der Publikationenzahl beschreiben.

$$Y = f(x)$$

Y = Anzahl der unterschiedlichen Prüfungsergebnisse
x = Anzahl der Publikationen

Wege zur Normierung mikrobiologischer Prüfungsverfahren für Konservierungsmittel (Referenzverfahren) zeigen u.a. die Vorschriften der USP XIX, die Empfehlungen der Arbeitsgruppe Interpharma-Mikrobiologie der Schweiz, veröffentlicht 1971 von BÜHLMANN et al., und evtl. die Publikation von BARBAROT (1964-65), welche in einem mikrobiologischen Belastbarkeitstest die Keimreduktion nach angegebenen Zeiten bestimmen ließen (6, 116).
REYBROCK und WERNER (91, 92, 93) verglichen in einer Studie die Ergebnisse von vier nationalen Methoden zur Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln, nach denen in 2 verschiedenen Laboratorien geprüft wurde. Man kann unschwer erkennen, daß die Reproduzierbarkeit mikrobiologischer Versuche auch bei normierten Prüfungsverfahren oft schlecht ist.
Sie testeten vergleichend die desinfizierende Kraft dreier Desinfektionsmittelstandards gegenüber Staph. aureus und Pseud. aeruginosa nach den 4 Prüfungsmethoden.

1. Suspensionsversuch der DGHM,
2. Suspensionstest der niederl. Kommission für Phytopharmazie,
3. "Use-Dilution-Method" der A.O.A.C. und
4. Kapazitätstest nach KELSEY und SYKES.

Die statistische Auswertung einer breit angelegten Zahl von Versuchen erbrachte signifikante Unterschiede in den Prüfungsergebnissen in Abhängigkeit von:

a. der Anzahl der Wiederholungen in einem Labor sowie in zwei Laboratorien
b. der Art des Desinfektionsmittels
c. der Prüfungsmethode
d. Stamm und Species der geprüften Keime.

Einige Prüfungsmethoden zeigten gute, andere dagegen schlechte Reproduzierbarkeit.

2.2.3.1 Prüfungsvorschriften und Forderungen nach ausreichender Konservierung
- Mikrobiologischer Belastungstest -

1. Abtötungsgeschwindigkeit

An die Abtötungsgeschwindigkeit von Keimen in Augenarzneien werden unterschiedliche Anforderungen gestellt. Nach der strengsten von KOHN und Mitarbeitern (58), der sich einige Autoren anschließen, sollen Erreger, auch bei hoher Keimeinsaat, innerhalb 1 Stunde abgetötet werden, mindestens jedoch nach 3 Std. BEAN fordert die Abtötung von $10^3$ Keimen/ml in 10 Min. USP XIX fordert unter dem Kapitel "Microbiological-Test" eine mikrobizide Wirksamkeit der Konservierungsmittel gegenüber Bakterien (99,9% Keimreduktion innerhalb von 14 Tagen) und mikrobistatische gegenüber Hefen und Pilzen (keine Vermehrung innerhalb 14 Tagen). Die überlebenden Keime dürfen sich während einer 28-Tage-Prüfzeit nicht vermehren. Eine Begründung für die lange Laufzeit der Prüfungen ist in der Möglichkeit einer erneuten Keimvermehrung zu suchen, denn Mikroorganismen können sich nach längerer Zeit unter Nutzung der Stoffwechselprodukte und Nucleinsäuren abgestorbener Zellen wieder vermehren.
Eine gegenüber der USP XIX verschärfte Anforderung an die Wirksamkeit von Konservierungsmitteln wird von der Interpharma Arbeitsgruppe Mikrobiologie in der Schweiz 1971 erhoben. Danach werden die Präparate - je nach Gefährdungsgrad - in 3 Kategorien eingestuft (116, 12).
Bei Präparaten der Kategorie 1 - z.B. Injectabilia, Augenpräparate - wird eine mikrobizide Wirksamkeit gegenüber Bakterien und Pilzen verlangt.
Bakterien = 99,9% Keimreduktion in einer Woche
Pilze = 99,9% Keimreduktion in zwei Wochen
Gesamte Testdauer = 4 Wochen

Die Einteilung der Arzneipräparate nach Gefährdungsgrad und eine erhöhte Anforderung an die Belastbarkeit von Konservantien in Augenarzneien ist ein gegenüber dem USP XIX-Test sinnvoller Weg zur Erhöhung der Arzneimittelsicherheit.

Kritisiert wird insbesondere, daß nach USP XIX ein Konservierungsmittel für wirksam gehalten wird, wenn die Anzahl der Hefen und Schimmelpilzen nach 14 Tagen konstant geblieben ist.

2. Prüfkeime

Die Aussagekraft eines Konservierungstests hängt weitgehend von der Auswahl der Prüfkeime und der Höhe der Keimsaat ab.

Da das antimikrobielle Wirkungsspektrum der einzelnen Konservierungsstoffe unterschiedlich ist, muß man ein möglichst breites Keimspektrum für einen Belastungstest einsetzen, wobei auch die Applikation und die Zusammensetzung des Präparates mit berücksichtigt werden sollten.
USP XIX schreibt zur Wirkungsprüfung der eingesetzten Konservierungsmittel fünf verschiedene Keimspezies vor, die in 20 ml Prüflösung aus einer in beschriebener Art hergestellten Impfsuspension inoculiert werden, so daß die Höhe der Keimeinsaat $10^5$-$10^6$ Keime/ml Prüflösung beträgt.
Als Testkeime werden folgende Stämme angegeben:
Candida albicans (ATCC Nr. 10231)[1]
Aspergillus niger (ATCC Nr. 16404)
Escherichia coli (ATCC Nr. 8739)
Pseudomonas aeruginosa (ATCC Nr. 9027)
Staphylococcus aureus (ATCC Nr. 6538).

3. Sensibilität der Stämme

Die hohe Empfindlichkeit der ATCC-Referenzkeime der USP XIX wird von einigen Autoren kritisiert (77, 123).
In eigenen Versuchen ließ sich zeigen, daß eine 99,9%ige Keimreduktion der Bakterien meist schon in Trägerflüssigkeiten für Augentropfen mit schwach antibakteriell wirksamen Substanzen wie Borsäure gelingt. Als besonders problematisch wird die angeblich hohe Sensibilität des angegebenen ATCC-Stammes von Pseud. aeruginosa angesehen, was den Einsatz weiterer Stämme insbesondere bei Belastbarkeitsprüfungen von Augenarzneien sinnvoll erscheinen läßt.

[1] American Typ Cultur Collection

Auf die zahlreichen Publikationen über die hohe Variabilität im Resistenzverhalten von Pseudomonas aeruginosa-Stämmen gegenüber allen bakterizid wirksamen Stoffen sei hier hingewiesen. Besonders eindrucksvoll in Hinsicht auf die sich aus dem Resistenzverhalten ergebenden Probleme zum Wirksamkeitsnachweis von Konservierungsmitteln gegenüber Pseudomonas aeruginosa ist eine von CARSON und Mitarbeitern publizierte Arbeit (11). Darin wird das unterschiedliche Resistenzverhalten von natürlich in Wasser vorkommenden Pseudomonas aeruginosa-Stämmen mit demjenigen subkultivierter Stämme verglichen. Pseud.aer.-Stämme zeigten differierende Wachstumscharakteristiken in Kulturmedien und unterschiedliches Resistenzverhalten gegenüber verschiedenen mikrobizid wirksamen Substanzen, je nachdem ob sie aus einem natürlichen Milieu oder einer subkultivierten Kultur stammten. Sie schienen während der Kultivierung ihre biochemischen Reaktionen zu ändern oder die Zellwand veränderte ihre Permeabilität.
Dieses Verhalten, das sich auch auf Stämme anderer Prüfkeime übertragen läßt, erklärt die eingeschränkte Aussagekraft von in vitro-Tests auf die Wirksamkeit von mikrobiziden Substanzen bei Gebrauch:

- Die Prüfkeime verhalten sich erstens anders als die Keime, die das Präparat bei Gebrauch verunreinigen.
- Die Prüfkeime verändern ihre Empfindlichkeit gegenüber antibakteriell wirksamen Substanzen durch die Weiterzüchtung in den einzelnen Laboratorien.

Die in Abb. 4 wiedergegebenen Absterberaten von zwei verschiedenen Pseud. aer.-Stämmen zeigen die gleichen Ergebnisse wie von CARSON (11) beschrieben.

4. Zur Anzahl der Testkeime und Höhe der Keimeinsaat

Wegen des hohen Arbeitsaufwandes eines Konservierungsmittelbelastbarkeitstests kann die Anzahl der einsetzbaren Keimspezies nicht sehr groß sein. Sie läßt sich nicht auf alle denkbaren Kontaminanten ausweiten. Es erscheint allerdings sinnvoll, außer den aufgeführten Bakterien noch ein oder zwei

Sporenbildner wie Bacillus subtilus oder Bacillus cereus mitzuprüfen und zudem evtl. verschiedene Stämme der gleichen Keimspecies.
Verglichen mit der beim Gebrauch der Arznei möglicherweise auftretenden Infektionskeimzahl ist die Keimeinsaat von $10^5$- $10^6$ Keimen/ml sehr hoch. Das ist berechtigt, da als Ausgleich für die geringe Anzahl von fünf Keimspecies auf eine höhere Belastbarkeit des Konservierungsmittels geprüft werden muß, als sie in der Praxis gefordert sein wird.

## 5. Die Vergleichbarkeit mikrobiologischer Prüfungen von Konservierungsmitteln

Bereits in den vorangestellten Ausführungen wurden einige wesentliche Kriterien für die Aussagefähigkeit und Vergleichbarkeit mikrobiologischer Prüfungen angeführt.
Die Streubreite ist in der mikrobiologischen Analytik auch unter gleichen Versuchsbedingungen wesentlich höher als diejenige von chemisch-analytischen Verfahren. Um reproduzierbare Prüfungsergebnisse bei Keimzahlbestimmungen oder Sterilitätskontrollen zu erhalten, darf nicht versäumt werden, eine ausreichende Anzahl von Parallelbestimmungen anzusetzen und wiederholte Ansätze einer Versuchsreihe stets nach gleichbleibenden Prüfungsmethoden durchzuführen (60). Einige wesentlichere Voraussetzungen für die Einhaltung gleicher Prüfungsbedingungen sind nachfolgend stichpunktartig aufgezählt:

1. Testkeime: Stamm und Spezies
2. Bedingungen für die Anzucht der Testkeime
2.1 Art der Nährmedien, Anzahl der Subkulturen, Bebrütungsdauer(Log-Phase oder Stat.-Phase), Pufferlösung zur Herstellung der Keimsuspension
3. Höhe der Keimeinsaat in die Prüflösung
4. Belastung des Konservierungsmittels in der fertigen Arznei, möglichst im Abgabebehälter, um inaktivierende Einflüsse mit zu berücksichtigen
5. Ausschaltung keimhemmender Einflüsse auf das Wachstum
5.1 durch Chemikalien (Enthemmungsstoffe)
5.2 durch Verdünnen
5.3 durch die Membranfiltermethode

6. Komposition der Nährmedien für die Keimzahlbestimmung
6.1 Bebrütungstemperatur
6.2 Bebrütungsdauer
7. Kontrollen
7.1 der Nährmedien auf wachstumshemmende Einflüsse (Wachstumskontrolle)
7.2 der Keimvermehrung in einer Probe ohne Konservierungsmittel

2.2.3.2 Prüfungsberichte zur Wirksamkeit der wichtigsten Konservierungsmittel für Augenarzneien

Übersichtsreferate zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Konservierungsmitteln für Augentropfen sind erschienen von: ABDOU, M.F.A., THROMB, Th.J.F., MULLEN, W., HAMACHER H., HÄDDI, A., WALLHÄUSER, OPHTHALMICA, A.P.V.
Wesentliche Beiträge über Prüfungsergebnisse zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Konservierungsmitteln publizierten: RICHARDS, R.M., DAVIS. J.A., FORSTER, J.N.S., MC GREGOR, D.R., KOHN, R.S., HUGO, B.W. und FORSTER, J.H.S., WIEDEMANN, B., THROMB, TH.J.F.
Einige der Literatur entnommene Ergebnisse zur Wirksamkeit von Konservierungsmitteln für wässrige Augenarzneien werden nachfolgend in sehr komprimierter Form aufgeführt. Bei einer vergleichenden Betrachtung gegenüber den im experimentellen Teil dieser Arbeit dokumentierten Ergebnissen können nur Arbeiten berücksichtigt werden, deren Testverfahren sich mit den eigenen Prüfungen vergleichen lassen.

Schwierigkeiten ergeben sich weiterhin aus den Spezies- und Stammesunterschieden der benutzten Testkeime, den Differenzen in der Höhe der Keimeinsaat und den Laufzeiten der Tests. Für die Beurteilung der mikrobiziden Wirksamkeit eines Konservierungsmittels in einer wässrigen Augenarznei kann es nicht sinnvoll erscheinen, Daten wie die "Minimale Hemmkonzentration" (MHK) oder die "Minimale Mikrobizide Konzentration" (MMK) als Kriterien heranzuziehen, die nach den Prüfungsvorschriften der DGHM zur Prüfung von Desinfektionsmitteln durchgeführt werden

und nicht den Verhältnissen bei Infektion während des Gebrauchs von Augentropfen entsprechen. Leider sind einige Autoren anderer Auffassung (85, 123). Aus Kenntnis der vielfältigen Einflüsse von Wirk- und Hilfsstoffen, Behältermaterial, pH-Wert u.a. auf die mikrobizide Wirksamkeit und Stabilität eines Konservierungsmittels kann man selbstverständlich aus den Prüfungsergebnissen nur Rückschlüsse auf die Wirksamkeit des betreffenden Konservierungsmittels bei Gebrauch ziehen, wenn man einen Konservierungsmittelbelastungstest durchführt, wie er z.B. unter "Antimicrobial preservatives-effectiviness" in der USP XIX beschrieben wird, oder in ähnlicher Weise die Absterberate der Testkeime in der zu prüfenden Lösung bestimmt.

1. Chlorhexidinacetat - Konz.: 0,005-0,01% (Hibitane).
Von den meisten Autoren wird Chlorhexidinacetat oder -gluconat als die heute allen anderen Konservierungsmitteln überlegene Substanz angesehen:
HÄDDI (40), ANDERSON (3, 4), HUGO und FORSTER (51), GASSET (32), DAVIS (16), KOHN (58), RICHARDS (96). KOHN berichtet, daß $2 \cdot 10^6$ Keime/ml von 13 verschiedenen Stämmen Pseudomonas aer. innerhalb 1 Stunde abgetötet werden.
HÄDDI prüfte die Wirksamkeit gegenüber Pseud. aer., Staph. aur. und Cand. alb. in verschiedenen Trägerflüssigkeiten für Augentropfen und fand Abtötungsgeschwindigkeiten von 30-120 Minuten bei $10^6$ Keimen/ml. Eingeschränkt wird die Verwendbarkeit von Chlorhexidinsalzen lediglich durch Ausfällung schwer löslicher Salze in Gegenwart von z.B. Sulfat, Bicarbonat, Phosphat, Borat. Nach DAVIES sind Chlorhexidinsalze auch fungizid und sporozid wirksam. Kombinationen mit 0,1% EDTANa steigern die bakterizide Wirksamkeit, besonders bei resistenten Pseudomonaden.

2. Benzalkoniumchlorid - Konz.: 0,01-0,02%
Nach HÄDDI ist die Substanz in wässriger Lösung (0,02%ig) und in Gegenwart nicht inaktivierender Substanzen wie Chlorid und Borsäure innerhalb von 90-120 Minuten gegenüber Pseud. aer., Staph. aur. und Cand. alb. mikrobizid wirksam. Andere Autoren geben 9 h gegenüber Pseud. aer.

in 0,01%iger Lösung an. Häufig werden Pseud. aer.-Stämme gegenüber Benzalkoniumchlorid resistent. Metallionen, insbesondere $Mg^{++}$ und $Ca^{++}$ setzen die Wirksamkeit stark herab. Kombinationen mit EDTA-Na oder Phenylethanol steigern die Wirksamkeit gegenüber resistenten Pseudomonaden (4), (8), (38), (97-99).

3. Organo-quecksilberverbindungen - Konz.: 0,001-0,002%

Die Literaturangaben sind widersprüchlich. Über ungenügende mikrobizide Wirksamkeit von Phenylquecksilberverbindungen berichten THROMB (110), WIEDEMANN (123), ANDERSON (5, 3). Eine unsichere Wirkung von Thiomersal wollen HOWORKA (50), PATZWALD (87) nachgewiesen haben. Nach HÄDDI werden von Pseud. aer., Staph. aur. und Cand. alb. $10^6$ Keime/ml bei Gegenwart von NaCl und Borsäure innerhalb von 2 Stunden abgetötet, nach KOHN 13 verschiedene Stämme Pseud. aer. innerhalb von 6 Stunden. ANDERSON fand resistente Pseudomonaden gegenüber 0,002%igen Phenylquecksilbersalzlösungen. Über die Entstehung einer Hg-Resistenz von Pseudomonaden durch biochemische Hg-Freisetzung wird auch an anderer Stelle berichtet.[1]

Insgesamt ist die Wirkung der Organo-Hg-Verbindungen im allgemeinen langsamer als diejenige von Chlorhexidinacetat und Benzalkoniumchlorid.

Zu ganz anderen Ergebnissen bezüglich der Keimtötungsgeschwindigkeit kommt WIEDEMANN bei der Prüfung von 4 Konservierungsmitteln in DAC-Augentropfenformulierungen nach dem Belastbarkeitstest der USP XIX: 18 der 41 (43,9%) untersuchten Zubereitungen erreichten nicht die Anforderungen der Interpharm-Arbeitsgruppe Mikrobiologie (99,9% Keimreduktion nach 7 Tagen).

---

[1] Es handelt sich um ein plasmidgebundenes und übertragbares Resistenzverhalten gegenüber quecksilberhaltigen Konservierungsmitteln, das in jüngster Zeit zunehmend auch bei anderen Keimen gefunden wird.

2.2.4 Physiologische Verträglichkeit von Konservierungsmitteln am Auge

Ob ein Konservierungsmittel am Auge reizlos vertragen wird, hängt entscheidend von seiner Konzentration in der Lösung ab. Die heute üblicherweise eingesetzten Konservierungsmittelkonzentrationen liegen auf einem schmalen Grad zwischen Unverträglichkeit durch Irritation des Auges und Unwirksamkeit durch ungenügende Keimreduktion.

| | | |
|---|---|---|
| Irritation des Auges<br>Verbesserte Keimreduktion durch mikrobizide Wirksamkeit | THERAPEUTISCHE KONZENTRATION | Bessere Verträglichkeit am Auge<br>Unsichere Keimreduktion teilweise mikrobistatische Wirksamkeit |

Konz. zunehmend ⟵ Konz. abnehmend ⟶

Berichte zur Verträglichkeit der meistbenutzten Konservierungsmittel am Auge lassen sich anhand des Literaturstudiums wie folgt zusammenfassen:

1. Salze des Chlorhexidins (meist 0,01%)

Das Chlorid wird schlechter vertragen als das Acetat und das Gluconat. Daher werden meist nur noch die beiden letzteren eingesetzt, insbesondere das Chlorhexidinacetat (1).
Die Allergisierungsquote von Chlorhexidinacetat ist sehr gering (107). In der BRD wurde kein Allergiefall bekannt. In der skandinavischen Literatur wird über einige Fälle von Kontaktallergien berichtet. ANDERSON testete 5 Jahre lang mehrere tausend Formulierungen mit Chlorhexidinacetat und konnte keine Irritation beobachten (4, 5).
GASSET (32) zeigte 1975, daß bis zu 2%ige Lösungen am Kaninchenauge nicht toxisch sind. Er hebt weiterhin die gute Eignung von Chlorhexidinacetat für Reinigungslösungen von

weichen Kontaktlinsen hervor, da auch bei Anreicherung in den Linsen und längerer Einwirkungszeit am Auge keine Reizungen beobachtet werden konnten.
DAVIS (17) beobachtete dagegen in allen Fällen mehr oder weniger schwere Augenallergien durch HEMA-Linsen, die über Nacht in Reinigungs- und Aufbewahrungslösungen mit 0,01-0,02% Chlorhexidinacetat gelagert waren und täglich 6 Stunden getragen wurden. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt RICHARDSON (94, 95). Dennoch scheinen Chlorhexidinacetat oder -gluconat nach den derzeit publizierten Untersuchungen die Substanzen mit der besten Verträglichkeit am Auge zu sein.

2. Quartäre Ammoniumverbindungen

2.1 Benzalkoniumchlorid (0,01-0,02%)

Quartäre Ammoniumverbindungen, insbesondere Benzalkoniumchlorid sollen die Cornea durch Auflösung des Interzellularzementes schädigen. Diese bei ANDERSON erwähnte Beobachtung wurde von HUGO und FORSTER (1964) (51) angezweifelt und später (1975) von THROMB erneut beschrieben (110). Wie unter Kap.1 beschrieben, wurden eine Anreicherung in HEMA-Linsen und die sich daraus ergebenden Unverträglichkeiten beobachtet.
GASSET et al. (32) konnten durch histologische Untersuchungen des Cornea-Endothelgewebes am Kaninchenauge die Toxizität von Benzalkoniumchlorid nachweisen und zeigen, daß die Substanz in der Lage ist, das gesamte Zellgewebe der Cornea zu schädigen.
Reizungen der Bindehaut bei kurzer Einwirkungszeit und Trübung der Hornhaut mit Läsionen nach 5-10 minütiger Einwirkung einer 0,01%igen Lösung wurden von SOEHRING und NEUWALD 1959 im Tierversuch nachgewiesen (106).

2.2 Cetrimid

Die Substanz soll ebenfalls hornhautschädigend wirken (1).

3. Organo-Quecksilberverbindungen (0,002-0,004%)
Über Allergisierung und Abscheidung von Quecksilber in der Cornea und in der Linse wird mehrfach berichtet (1, 51, 85). Zu Verfärbungen kommt es erst nach längerem Gebrauch bei 0,004%igen bis 0,01%igen Lösungen. Daher sind Konzentrationen über 0,002% nicht zu empfehlen. SOEHRING und NEUWALD (106) fanden bei 0,001%iger Phenylquecksilberborat-Lösungen die gleichen toxischen Nebenwirkungen wie bei 0,01%igen Lösungen von Benzalkoniumchlorid (siehe 2.1).

## 3 Der oligodynamische Effekt von Schwermetallen

Die Suche nach einer Möglichkeit, auf Konservierungsmittel zu verzichten und dennoch eine mikrobielle Kontamination nach mehrmaligem Öffnen des Behälters auszuschließen, führte zu dem altbekannten "oligodynamischen" Effekt von Schwermetallen. Unter dem Begriff "oligodynamische Wirkung" (= in kleinen Mengen wirksam), der von NÄGLI Ende des letzten Jahrhunderts bei seiner Entdeckung der wachstumshemmenden Wirkung geringer Kupfermengen bei Algen geprägt wurde, versteht man eine antimikrobielle Wirkung von Schwermetallen wie Ag und Cu in ppb-Mengen.
Silber hat nach Cadmium die beste oligodynamische (d.h. antimikrobielle) Wirksamkeit. Diese Tatsache ist in zahlreichen Publikationen seit NÄGLI immer wieder bestätigt worden.
Es war demnach zu prüfen, ob bei den Ergebnissen eines Konservierungsmittelbelastungstests nach USP XIX die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber in oligodynamischen Mengen ausreicht, um die Keimfreiheit in flüssigen Augenarzneien während des Gebrauchs zu bewahren ("konservieren"), und zum anderen, ob eine ausreichende Wirksamkeit gegen die gefährlichsten Kontaminanten von Augentropfen gegeben ist.

### 3.1 Zur Pharmakologie von Silber

Der zunächst wichtigste Aspekt, die Frage nach der physiologischen Verträglichkeit und Toxizität am Auge, kann als sehr günstig angesehen werden, da mit 10 ml Augentropfen nur 1 - 2

,ug Silber appliziert werden. Die Gefahr einer Argyrose durch Ablagerung von Silber in der Cornea ist bei Verwendung dieser geringen Mengen absolut nicht gegeben. Zu einer Einlagerung von Silber in den verschiedenen Organen wie Leber, Niere, Milz bei peroraler Applikation über längere Zeit kommt es erst nach Aufnahme von Silbermengen über 15g. Selbst bei diesen histologischen Befunden konnte im Tierversuch bisher eine Toxizität von Silber nicht nachgewiesen werden (7, 55, 37, 92, 84, 118).

In den letzten 10 Jahren wurde zunehmend über die Verwendung von Silbersalzen als Aerosole zur Bekämpfung von Hospitalismuskeimen (57) und über die Behandlung von Brandwunden mit Silbernitratlösung und silberimprägnierten Verbandsstoffen berichtet. Die durch Antibiotika schlecht beherrschbaren Pseudomonadeninfektionen konnten wirksam bekämpft werden, wenn die Verbände mit 0,5%iger Silbernitratlösung getränkt wurden. Im Rahmen dieser Behandlung gingen die Autoren der Toxizitätsfrage von Silbernitrat mit Sorgfalt nach und konnten wiederholt seine Unbedenklichkeit bestätigen. CASON und Mitarbeiter beobachteten z.B. bei 192 mit Silbernitratlösung behandelten Brandwunden nur 1 Fall von Argyrose (10, 57, 75, 90). Gleiche Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren in verschiedenen Tierexperimenten erzielt.
In einer amerikanischen Studie aus dem Jahre 1940 wird dargelegt, daß ein erwachsener Amerikaner täglich 0,6 - 0,8 mg Silber durch den Gebrauch von versilberten Eßbestecken aufnimmt. Demgegenüber kann die in Augentropfen eingebrachte Silberdosis als völlig unbedenklich angesehen werden.

## 3.2 Historisches zur oligodynamischen Wirkung von Silber

NÄGLI hatte mit seinen Arbeiten eine Beobachtung wissenschaftlich ausgewertet, die seit Jahrtausenden bereits praktisch genutzt wurde, nämlich der Gebrauch von Silberkrügen und Silberbechern als Trinkgefäße, oder in jüngerer Zeit Silberfolien zum Abdecken von Wunden.
ZIMMERMANN schreibt in einem kurzen historischen Abriß über

die Anwendung der oligodynamischen Silberwirkung, daß bereits 2 500 v.Ch. König Cyros bei seinen Kriegen Flußwasser in silbernen Krügen mit sich führte. Im Sanskrit findet man Hinweise, daß Kupfer und Silber die Wasserqualität verbessern. Im Habsburger Kaiserhaus soll eine silberne Geburtenzange gebraucht worden sein (132, 137).
Aus den Beobachtungen NÄGLIS entwickelte sich eine umfangreiche Oligodynamieforschung. Nach NEISSER und EICHBAUM wird der Begriff "oligodynamische Metallwirkung" definiert als "die Wirkung kleinster (oligos = wenig) Mengen elektropositiv geladener Metallionen auf lebende Stoffe". Diese veraltete Definition soll im Rahmen dieser Arbeit besser als antimikrobielle Wirkung beschrieben werden.
Die oligodynamische Wirkung ist am stärksten bei Cadmium und nimmt nach WALLHÄUSER in der nachstehenden Reihenfolge ab (48, 119).

Cd Ag Messing Cu Hg
Es folgen: Zn Fe Sn Al

Über die Ergebnisse der älteren Oligodynamieforschung soll hier nicht berichtet werden. Darüber existieren umfangreiche Sammelreferate: 1922 (SÜMPFLE), 1932 (NEISSER und EICHBAUM), 1939 und 1952 (ZIMMERMANN), 1956 (OBERZILL).

Über das chemische und biologische Wirkungsprinzip oligodynamisch wirkender Metalle, von denen Silber das mit Abstand am häufigsten verwendete und daher auch am besten untersuchte ist, gibt es in Expertenkreisen ein weitgefächertes Spektrum unterschiedlicher Meinungen.
Den besten zusammenfassenden Bericht über die in Amerika und Europa erschienene Literatur zur Oligodynamieforschung findet man bei ROMANS (102) 1968.
Interessenten finden hierin neben Theorien über den Mechanismus der antimikrobiellen Silberwirkung ("oligodynamische Aktivität") auch Angaben über Verfahrens- und Anwendungstechnologien sowie über toxikologische Aspekte bei Behandlung mit Silberpräparaten.

Neben ROMANS kritisiert auch eine Reihe anderer Autoren (125), daß immer noch so viel Unklarheit über das Wirkungsprinzip von Silber in oligodynamischen Mengen besteht, weil zu Unrecht oft aus den Ergebnissen von Versuchen, deren experimentelle Daten nicht korrelieren, vergleichende Schlußfolgerungen gezogen werden.

"Many investigators who have studied oligodynamic silver, for instant have not always taken into consideration the several valences possible for silver, the various complexes that it can form, the effect of other metals or effect of adsorbent, oxidizing or reducing materials on silver and silver compounds and so have reported theories and reactions that are disconcertingly analogous to the reports of the men who studied the elephant in the old Buddhist parable" (102).
(Jede Gruppe befühlt einen kleinen Teil des Elefanten und schließt daraus, daß das Ganze ähnlich aussieht. Daher wird jede Aussage falsch).
Die antimikrobielle Wirkung der Schwermetalle wird von den meisten Autoren als eine reine Metallionenwirkung angesehen. Es wurde gezeigt, daß der keimtötende Effekt eine Funktion der in Lösung befindlichen Metallionenkonzentration ist.
So stellte man auch fest, daß reines Ag-Metall keine keimtötende Wirkung zeigt (36), sondern diese erst entweder durch oberflächliche Oxidation durch Luftsauerstoff oder Behandlung mit $CO_2$ oder $H_2O_2$ erhält (sog. "Aktivierung").
Als Silbersalze wurden bei nahezu gleicher oligodynamischer Wirkung eingesetzt: AgCl, $Ag_2CO_3$, $Ag_2SO_4$, $AgNO_3$, $Ag_2O$ (13).
Andere Autoren sind der Meinung, daß die antimikrobielle Wirkungsstärke von Silber nicht allein als Funktion der in Lösung befindlichen $Ag^+$- Ionenkonzentration angesehen werden kann, sondern daß undissozierte Silbersalze und Silberkomplexe ebenfalls wirksame Formen sind (39, 57, 102, 129).
Die Auffassung muß aus mehreren Gründen als berechtigt angesehen werden (siehe 3.4 und 3.7).
1. Silbersalzlösungen mit hoher Chloridkonzentration, in denen die $Ag^+$-Konzentrationen rechnerisch weit unterhalb der oligo-

dynamisch wirksamen liegt sind im mikrobiologischen Versuch bei ausreichend langer Kontaktzeit antimikrobiell wirksam.
2. Silberoxid ist gegenüber anderen Silberverbindungen bei gleicher $Ag^+$ - Ionenkonzentration besser wirksam.

### 3.2.1 Technische Verfahren zur Keimreduktion von Wasser durch Silber

Aus den Beobachtungen einer antimikrobiellen Wirksamkeit von Silberionen hat man Verfahren zur Entkeimung von Wasser durch Silberung entwickelt.
Am häufigsten wurde Silber zur Entkeimung von Trinkwasser in Brunnen kleiner Landgemeinden oder in Containern von Schiffen eingesetzt. Daneben werden Silberungsverfahren für die Getränkeindustrie und für die keimarme Lagerung von destilliertem Wasser in Apotheken beschrieben (2, 7, 15, 43, 48, 83, 84, 102).
Diese letztgenannten Einsatzmöglichkeiten von Silber sind heute obsolet und durch geeignetere Verfahren ersetzt.
In der Bundesrepublik Deutschland ist für die Trinkwasserbereitung die Silbermenge auf 0,1 mg $Ag^+$/l beschränkt. In den USA sind 0,05 mg $Ag^+$/l zugelassen.

Technische Verfahren der Wassersilberung

1. Filtration über poröse silberhaltige Filtermaterialien (Steril-, Katadyn-Verfahren)
   oder Einlegen von versilberten Keramikkörpern in Form von Ringen oder Kugeln in die Behälter
2. Elektrosilberung (Elektrokatadynverfahren, Cumasina-Verfahren)
3. Zusatz von Silberverbindungen wie Micropur $^R$ (ein Silber-NaCl-Präparat mit 1% Silber) oder Movidyn $^R$ (ein Silber-Kolloid-Präparat).

Publikationen über technische Silberverfahren von Wasser sind besonders zahlreich in den Jahren 1930-1960 erschienen.

## 3.3 Silberverluste aus der Lösung durch Adsorbentien

Das hohe Adsorptionsvermögen vieler Substanzen gegenüber Silberionen muß bei allen chemisch- und mikrobiologisch-analytischen Arbeiten mit Silberverbindungen berücksichtigt werden, um nicht zu falschen Ergebnissen zu gelangen. Diese Eigenschaften von Silber, sich metallisch an Gefäßwänden abzuscheiden oder in diese zu permeieren, ergibt sich aus seinem physikalisch-chemischen Verhalten und seiner ausgeprägten Tendenz zur Komplexbildung (vgl. GEMLIN: Handbuch der anorg. Chemie (33) ).

### 3.3.1 Wandadsorption

Bei oligodynamischen Versuchen mit Silber wurde wiederholt auf die Abnahme der mikrobiziden Wirksamkeit durch Silberverluste infolge Adsorption an die Gefäßwände hingewiesen. Die Höhe der von Gefäßwänden adsorbierten Silbermengen hängt von der $Ag^+$ - Anfangskonzentration ab und kann, wenn diese klein ist, zur vollständigen Aufhebung der antimikrobiellen Wirksamkeit führen (7, 82, 125, 131). STRUEMPLER, A.W. (109) und WEST, F.K. (121) haben die Adsorptionskapazitäten von verschiedenen Glassorten und einigen Kunststoffen gegenüber Silber untersucht. Die Silberverluste durch Wandadsorption hängen demnach von der Glassorte, der Kunststoffsorte und weiterhin vom pH-Wert und der Temperatur der Lösung ab. Borosilikatgläser zeigen eine Austauschkapazität von $Na^+$ gegenüber $Ag^+$ , mit größerer Affinität zu Silber.

### 3.3.2 Adsorption an Mikroorganismen

Die Abnahme der $Ag^+$ - Ionenkonzentration aus der Lösung durch Adsorption an Keime wird von einer Reihe von Autoren beschrieben (ZIMMERMANN, OBERZILL, BRAUNE, NEISSER und EICHBAUM).

Sie erklärt sich u.a. aus dem unter 3.6 beschriebenen Komplexierungsverfahren von Silber gegenüber Proteinen. Die Menge

des gebundenen Silbers hängt von der Höhe der Keimeinsaat ab. Nur die zunächst an die Zellwände von Bakterien gebundenen Silberionen sind in der Lage, die Keime zu schädigen. Die Reversibilität der Silber-Bakterien-Komplexe ist ein Grund für die geringe Abtötungsgeschwindigkeit von Keimen und die Möglichkeit der Verdrängung von Silber durch andere Kationen (siehe Kap. 3.5 und 3.7).

### 3.3.3 Verwendung schwer löslicher Silbersalze

Aus den Ausführungen über das Adsorptionsverhalten von Silber geht hervor, daß Verluste von $Ag^+$ - Ionen aus einem anderen Silberdepot ausgeglichen werden können, z.B. durch elektrolytische Silberabscheidung oder durch Zugabe von Silber in Form von schwer löslichen Salzen. Schwer lösliche Salze mit einem für die oligodynamische Wirkung geeigneten Löslichkeitsprodukt sind Silberchlorid (67) und Silberbromid, welche insbesondere wegen ihrer leichten Schmelzbarkeit zu Formlingen verarbeitet werden oder in der Schmelze über Keramikringe gezogen werden können. Die Ringe oder Formlinge können in Augentropfflaschen eingebracht werden und als "Silberdepot" die Aufrechterhaltung einer ausreichend bakteriziden Silberkonzentration in der Lösung gewährleisten.
Silberchlorid läßt sich auch in die Poren poröser Glas- oder Keramikplatten wie Fritten fällen, die dann als Ringe in die Pipetten der Tropfflaschen eingesetzt werden können.

AgBr: Schmp. 434 °C $K_L = 5.10^{-13}$
AgCl: Schmp. 455 °C $K_L = 2{,}8.10^{-10}$ bei 25 °C

Die Löslichkeit von AgCl in Wasser nimmt mit steigender Temperatur stark zu. Bei 25 °C lösen sich 1,5 mg $Ag^+/l$ in Wasser (33
Da für die Verwendung von Silberchlorid als Konservierungsmittel in Augentropfen die $Ag^+$- Dissoziation selbstverständlich durch andere Ionen, insbesondere Chlorid, beeinträchtigt wird, kann man bei der zu erwartenden Silberionenkonzentration nicht von den Verhältnissen in rein wässriger Lösung ausgehen, sondern muß durch geeignete Meßverfahren die $Ag^+$ - Ionenkonzentration für eine bestimmte Komposition jeweils bestimmen.

Die Löslichkeit von AgCl in Chlorid-Ionen enthaltenden wässrigen Lösungen nimmt mit zunehmender Chlorid-Konzentration zunächst ab, passiert ein Minimum bei $10^{-3}$ m/l $[Cl^-]$ und steigt schließlich bei erhöhter Chlorid-Konzentration wieder an.
Die anfängliche Abnahme ist bekanntlich eine Folge der $Cl^-$ - Zunahme im Löslichkeitsprodukt $K_L = [Ag^+] \cdot [Cl^-]$, während der spätere Anstieg auf die Bildung der Komplexe $[AgCl_2]^-$, $[AgCl_3]^{2-}$ und $[AgCl_4]^{3-}$ zurückzuführen ist.
Eine Löslichkeitssteigerung von Silberchlorid durch Bildung von solchen Argentatkomplexen spielt bei physiologischen NaCl-Konzentrationen, wie sie in Augentropfen vorkommen können, keine wesentliche Rolle.

Metallisches Silber - oberflächlich oxidiert:
Neben der Verwendung von Silberhalogeniden zur Aufrechterhaltung einer wirksamen $Ag^+$ - Konzentration in der Lösung ist es möglich, ein Silberdepot aus versilberten Gefäßwänden zu schaffen, deren Oberfläche aus den unter 3.1 genannten Gründen mit $H_2O_2$ oxidiert wird. Man kann z.B. Augentropfenpipetten aus Kunststoff mit einem Silberüberzug versehen, aus dem ausreichende Mengen $Ag^+$ - Ionen in Lösung gehen.
Silberoxid $Ag_2O$ ist in Wasser besser löslich als Silberchlorid. Bei 20 °C lösen sich etwa $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ m $Ag^+$/l.
$Ag_2O$ löst sich als amphoteres Oxid pH-abhängig in Wasser unter Bildung von $Ag^+$ bzw. Hydroxokomplexen AgOH und $[Ag(OH)_2]^-$
Die auf versilberten Gefäßwänden durch oberflächliche Oxidation erhaltenen Schichten bestehen aus einem Gemisch aus Silber und Silberoxid mit unterschiedlichen kristallographischen Eigenschaften und einer Zersetzungs- sowie Lösungskinetik, die von der Art des Aufbringens der Schichten abhängt.
$Ag_2O$ zeigt nach Untersuchungen von PAULI und Mitarbeiter gegenüber Proteinen ein anderes Komplexierungsverhalten als z.B. $AgNO_3$. Aus $Ag_2O$ wird mehr Silber an Proteine gebunden als aus $AgNO_3$ - Lösungen.
Daraus könnte man auf eine sehr gute antimikrobielle Wirksamkeit des Silberoxids schließen.
Wie im experimentellen Teil nachzuweisen ist, werden im mikrobiologischen Belastungstest Keimreduktionen erhalten, die den

Anforderungen der USP XIX genügen.

### 3.4 Die antimikrobiellen Eigenschaften von Silbersalzen

Das Verhalten von Silber gegenüber Keimen unterscheidet sich nicht wesentlich von demjenigen anderer Konservierungsmittel, z.B. Resistenzentwicklung bei unterschwelligen Silberkonzentrationen und unterschiedliche Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Stämmen einer Spezies. Häufig subkultivierte Laborstämme zeigen eine größere Empfindlichkeit gegenüber Silber als frisch isolierte (7, 92, 83, 131-133).

#### 3.4.1 Keimtötungseffekt gegenüber Bakterien

Die nachfolgend aufgeführten Daten sind den Publikationen über oligodynamische Versuche mit Silber entnommen. Da Silber hauptsächlich zum Zwecke der Wasserentkeimung verwendet wurde, beziehen sich die Literaturangaben größtenteils auf Keimtötungsversuche gegenüber in Wasser auftretenden Keimarten (7, 43, 65, 112, 78, 131, 134).
Silber ist innerhalb kurzer Zeit antibakteriell wirksam gegenüber gramnegativen Stäbchen und Kokken wie E. coli, Proteus-Arten, Salmonellen, Aerogenes, Typhusbacillen, Heubacillen. Silber wirkt etwas langsamer bakterizid gegenüber grampositiven Kokken, wie Staphylokokken und Streptokokken und sehr gering bakterizid gegenüber Sporenbildnern.

#### 3.4.2 Keimtötungseffekt gegenüber Pilzen, Hefen, Sporen

Silber soll gegen diese Erregergruppe unwirksam sein. Nach Beobachtungen von HERRMANN werden Sporen am Auskeimen gehindert (7, 43, 131).

#### 3.4.3 Die Höhe der Keimeinsaat

Wie nicht anders zu erwarten, ist die Höhe der Keimeinsaat ein begrenzender Faktor der Silberwirkung gegenüber Bakterien. OBERZILL fand, daß die Keimtötungsgeschwindigkeit bei einer

Keimeinsaat zwischen 40 und 40 000 Keimen/ml nahezu konstant ist und erst bei höherer Keimeinsaat abnimmt (82).

## 3.5 Faktoren, welche die oligodynamische Wirkung von Silber beeinflussen

Die mikrobizide Wirksamkeit von Silber unterliegt einer Reihe von Einflüssen (chemischer und physikalischer Art)

1. die Silberionenkonzentration
2. andere Salze, Komplexbildner
3. organische Substanzen und Makromoleküle
4. die Temperatur
5. der pH-Wert der Lösung

### 3.5.1 Die Silberionenkonzentration

Wie bereits erwähnt und in der Vielzahl von Publikationen beschrieben, hängt die mikrobizide Wirksamkeit von Silber von der Höhe der in Lösung befindlichen und zur Adsorption an die Bakterienzellwände bereitstehenden Silberionenkonzentration ab. Beobachtungen bei chloridhaltigen Silbersalzlösungen, in denen die $Ag^+$ - Konzentration rechnerisch bis unterhalb der Wirksamkeitsgrenze zurückgedrängt wird und die trotzdem eine bakterizide Wirksamkeit zeigen, geben wie bereits erwähnt zu der Vermutung Anlaß, daß auch Silberkomplexe von Bakterien adsorbiert werden (102, 129). Somit wäre die mikrobizide Wirksamkeit nicht allein von der $Ag^+$ - Ionenkonzentration in der Lösung abhängig, eine Vermutung, die auch aus Untersuchungen in NaCl-Lösungen des experimentellen Teils dieser Arbeit bestärkt werden kann. Die Abtötungsgeschwindigkeit ist in chloridhaltigen Lösungen allerdings herabgesetzt. In der älteren Literatur findet man sehr weit variierende Angaben über die Höhe der oligodynamisch wirksamen $Ag^+$ - Konzentration. Sie reicht von 3-500 µg Ag/l (78). Meistens werden 100-200 µg $Ag^+$ /l als wirksam befunden. Aus den unter 3.5 aufgeführten Daten ist ersichtlich, daß sich eine bakterizid wirksame Konzentration der in Lösung befindlichen $Ag^+$ - Ionen nicht

für den Allgemeinfall festlegen läßt, sondern nur für eine bestimmte Komposition im mikrobiologischen Versuch ausgetestet werden kann.

3.5.2 In der Lösung vorhandene Elektrolyte ( 23, 63, 64, 82).

Die Beeinflussung der mikrobiziden Silberwirkung durch Elektrolyte soll zweierlei Ursachen haben:

1. die Dissoziation der Silbersalze wird zurückgedrängt oder gesteigert,
2. Adsorptionsverdrängung durch andere Kationen, die ebenfalls an der Bakterienoberfläche adsorbiert werden.

3.5.2.1 Hemmung der antibakteriellen Wirksamkeit

Säuren und Salze starker Säuren wirken hemmend durch Herabsetzung der Bindungsfähigkeit von Metallionen an die Zellwände der Keime. Insbesondere sollen $H^+$ - Ionen kompetitiv die $Ag^+$ - Ionen von der Bakterienoberfläche verdrängen (8, 129, 131). LEITNER (64) will in seinen Untersuchungen "Zur Theorie der Salzhemmung" konzentrationsabhängige Einflüsse von Alkali- und Erdalkalimetallen auf die Silberwirkung beobachtet haben, die sowohl eine Steigerung wie eine Schwächung der Bakterizidie verursachen können. WUHRMANN und ZOBRIST (129) erklären den hemmenden Einfluß von $Ca^{2+}$ - Ionen als eine Permeabilitätsantagonismus an der Zellwand zwischen $Ca^{2+}$ und $Ag^+$ . Andere Autoren wie OBERZILL (95) kommen zu ähnlichen Resultaten, aber letztlich konnte noch niemand die Ursache für die Verlängerung der Abtötungszeit in Gegenwart gewisser Elektrolyte ergründen, insbesondere nicht für solche, die keinen nennenswerten Einfluß auf die Dissoziation der Silbersalze haben.
Folgende Ionen sollen einen hemmenden Einfluß auf die Silberwirkung ausüben:
Halogene: $J^-$ , $Br^-$ , $Cl^-$ ,
Phosphate, Sulfate, Ammoniumsalze, Thiosulfat
$H^+$ - Ionen, $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Na^+$ .

3.5.2.2 Vollständige Aufhebung der Silberwirkung

Sulfidionen, Cyanidionen, Rhodanid- und Jodidionen drängen die $Ag^+$ - Ionenkonzentration unter die antimikrobiell wirksame zurück. Cyanid bindet Silber aus seinen Proteinkomplexen und hebt damit eine keimschädigende Silberbindung wieder auf.

3.5.2.3 Steigerung der Silberwirkung

Alkalisch reagierende Salze und Laugen sollen die Silberwirksamkeit erhöhen, indem sie die Adsorptionskraft der Bakterien gegenüber Metallionen durch Zunahme des negativen Potentials an der Bakterienoberfläche verbessern[1] (LEITNER, EICHBAUM, NEISSER, BROWN, IKEDA, ZIMMERMANN, OBERZILL, BRAUNE, WORATZ u.a.).

3.5.3 Organische Substanzen und Makromoleküle

Alle organischen Komplexbildner können in Abhängigkeit von ihrer Komplexbildungskonstanten die Silberwirkung herabsetzen (siehe 3.8 ).
Thioglycolat, Proteine, Zelluloseester, Citrate u.a.

3.5.4 Temperatur und pH-Wert

WUHRMANN (129) hat den Einfluß der Temperatur und der $H^+$ - Ionenkonzentration in Abhängigkeit von der Silberkonzentration anhand statistischer Auswertungsmethoden am besten untersucht, so daß auf die Wiedergabe der anderen zum Teil oberflächlichen Publikationen verzichtet werden kann.
Er fand, daß unabhängig von der $Ag^+$ - Konzentration bei Temperaturerhöhung um 10 $^{o}C$ und bei pH-Erhöhung um 1 die Abtötungsgeschwindigkeit um den Faktor 1,6 zunimmt. Diese Ergebnisse überraschen nicht, da die Zellschädigung, wie auch bei anderen antibakteriell wirksamen Substanzen, in einem hohen Maße durch das pH-abhängige Wasser-Lipoid-Verteilungsverhalten von Silber beeinflußt wird ( Über Dissoziation von DNA-Ag-Komplexe: Kap. 3.7.4).

[1] Diese Beobachtungen sollten besser als Stabilitätsänderung von Silber-Protein-Komplexen erklärt werden.

### 3.5.5 Die Einwirkungszeit des Silbers

Bei Silber ist mit einer längeren Abtötungszeit als bei den Organoquecksilberverbindungen und quartären Ammoniumsalzen zu rechnen. Die meist angegebene Zeit für die Abtötung von $10^6$ - $10^8$ E. coli-Keimen /ml in Wasser beträgt 6 Stunden, für resistentere Stämme länger, bei einer $Ag^+$ - Konzentration von ca. 100 µg/l.

### 3.6 Kritik an den mikrobiologischen Prüfungsmethoden

An dieser Stelle sei auf die Ausführungen unter 2.2.3 und 2.2.3.1 verwiesen.
Sehr viele der älteren Publikationen über Keimtötungsversuche durch Silber entsprechen nicht mehr dem heutigen Stand der mikrobiologischen Analytik.
Die Untersuchungsmethoden sind oft ungenügend beschrieben, die Anzahl der Proben und Parallelbestimmungen ist ungenügend und vieles andere mehr, so daß diese Angaben nur mit Vorsicht der Beurteilung einer mikrobiziden Silberwirksamkeit zugrundegelegt werden können.

### 3.7 Zum antimikrobiellen Wirkungsmechanismus von Silber in ppb-Mengen

Die ältere Oligodynamieforschung hinterläßt eine Fülle von Literatur mit Theorien über die möglichen Ursachen der wachstumshemmenden Wirkung von Silber auf Mikroorganismen.
NEISSER und EICHMBAUM berichten in einem Übersichtsreferat 1932 über die oligodynamische Metallwirkung. Etwas geringeren spekulativen Charakter haben die Arbeiten von OBERZILL 1956 und ZIMMERMANN 1952, die aber mangels experimenteller Beweise auch nur als sehr unbefriedigend angesehen werden können.
In den letzten 20 Jahren sind keine grundlegenden Arbeiten zum oligodynamischen Wirkungsmechanismus mehr publiziert worden. Lediglich in zwei Untersuchungen von MODAK und FOX (74) und von JENSSEN und Mitarbeitern (54) - über beide wird nachfolgend berichtet - kann im mikrobiologischen Versuch die Silberbindung an die Zellbestandteile von Pseudomonas und E. coli

geklärt werden. Aus den mikrobiologischen Ergebnissen dieser Arbeit und dem chemischen Verhalten von Silber gegenüber Proteinen und Aminosäuren soll hier versucht werden, die Einzelbeobachtungen vieler Publikationen in einen Zusammenhang zu stellen.

### 3.7.1 Zum Wirkungsmechanismus von Schwermetallen

Schwermetalle werden in ionogener oder komplexer Form an der Bakterienoberfläche fixiert und entfalten dann erst langsam ihre Wirkung.
Eine Tiefenwirkung durch freiwerdende Schwermetallionen erklärt sich aus der Dissoziation der Organometallkomplexe.
Durch die schlechte Löslichkeit der Sulfide und die Affinität der Schwermetallionen zu SH-Gruppen werden Fermente blockiert und Eiweiße denaturiert.
Das sehr variable Komplexierungsverhalten der Schwermetalle gegenüber Makromolekülen führt zu einer spezifischen Affinität gegenüber bestimmten Bakterienmembranen.

### 3.7.2 Die Silberadsorption

ZIMMERMANN fand bei seinen Untersuchungen über den oligodynamischen Wirkungsmechanismus von Silber 1952, daß Silber durch polare Adsorption zu 90% an der äußeren Bakterienwand gebunden wird und sich durch chemische Methoden von dort wieder ablösen läßt, wie z.B. durch Citrat, Thiosulfat oder Thioglycolat.
Unter polarer Adsorption versteht er die Komplexbindung von positiven Metallionen an die negativ geladenen Bakterien.
Im Elektrophorese-Versuch wurde gezeigt, daß der Bakterien-Metall-Komplex elektrisch neutral ist.
In Konkurrenz von Silberionen sollen auch andere Kationen an der Bakterienwand adsorbiert werden und somit die oligodynamische Silberwirkung hemmen können. LEITNER hat 1929 die Verdrängung des Metalls durch andere Stoffe, die an der Bakterienwand adsorbiert werden, untersucht und Hemmungskurven, insbesondere für Salze starker Säuren (siehe 3.5.2.1), aufgestellt.

Der Wirkungsmechanismus von Silber in oligodynamischen Mengen (ppb-Mengen) konnte letztlich noch nicht geklärt werden. ZIMMERMANN hält eine Entwicklungshemmung durch mechanische Absperrung der Zellmembran oder eine mechanische Hemmung der Zellteilung für wahrscheinlich.

### 3.7.3 Zur bakteriziden und bakteriostatischen Wirkung des Silbers

Wenn das an der Bakterienoberfläche adsorbierte Silber durch Komplexbildner mit einer gegenüber Silber hohen Komplexbildungskonstante wieder abglöst wird, so kann es sich dabei nur um eine bakteriostatische Wirkung des Silbers handeln. Der Nachweis, daß durch Silber geschädigte Bakterien sich nach Behandlung mit Thiosulfat- oder Citratlösung wieder vermehren können, wurde von einigen Autoren erbracht.
Verschiedentlich wurde darauf hingewiesen, daß durch Silber geschädigte aber nicht abgetötete Mikroorganismen in Thioglycolat-Nährmedien besonders gut wieder auskeimen (8). Ein Effekt, der sich aus dem Komplexierungsverhalten von Silber leicht erklären läßt. Ohne an dieser Stelle auf die Kriterien der mikrobiologischen Wirksamkeitsprüfung von Konservierungsmitteln näher eingehen zu wollen, soll hier darauf hingewiesen werden, daß die Fehlinterpretationen bei den meisten diesbezüglichen Arbeiten in dem Versäumnis zu suchen sind, die gebundenen und nicht gebundenen Silbermengen durch einen geeigneten Komplexbildner wie Na-Thioglycolat in ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit zu hemmen. Dabei kann entweder die zu prüfende Lösung mit einer Na-Thioglycolat-haltigen Pufferlösung gemischt oder in ein Nährmedium, das Na-Thioglycolat oder einen anderen geeigneten Hemmstoff enthält , inoculiert werden.
Daß Silber in oligodynamischen Mengen nicht nur bakteriostatisch sondern auch bakterizid wirkt, ist durch zahlreiche Versuche nachgewiesen worden. Die Voraussetzungen für eine bakterizide Wirkung sind, wie bereits erwähnt: ausreicherd hohe Konzentrationen an wirksamem Silber, insbes. Proliferation von Silber aus einem Silberdepot, und genügend lange Einwirkungszeit.

Silber wird aus sehr niedrig konzentrierten Lösungen stark von den Mikroorganismen aufgenommen und in der Zellmasse angereichert.

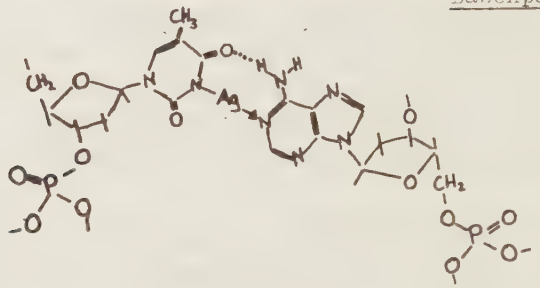
Untersuchungen an durch Silber letal geschädigten Bakterien und Hefen zeigen eine Anreicherung von $10^5$ bis $10^7$ $Ag^+$ - Ionen pro Zelle.
Die letale Dosis an oligodynamisch wirksamem Metall wurde von NEISSER und EICHBAUM mit 1% der Bakterienmasse angegeben, von ZIMMERMANN mit 0,8% Silbergehalt bei Tuberkelbazillen.
Die Frage, ob durch die beschriebene Konzentrationsanreicherung die oligodynamische Wirkung grundsätzlich das Gleiche wäre wie eine chemische Schwermetallvergiftung, wird von ZIMMERMANN verneint. Als Begründung führt er die Anreicherung von oligodynamisch wirksamen Metallen allein an der Zellmembran an, wohingegen von Schwermetallgiften neben der Zellwand auch das Plasma irreversibel geschädigt wird.

### 3.7.4 Bindung von Silber an mikrobielle Zellproteine und Nucleinsäuren, insbesondere an DNA

Durch die Arbeiten von MODAK und FOX (74), die 1973 in einer sehr umfangreichen Untersuchung mit Hilfe radiochemischer Messungen die Bindung beträchtlicher Silbermengen an DNA von Pseudomonas aeruginosa nachwiesen, kann die Annahme von ZIMMERMANN u.a. Autoren, nach der Silber allein an der äußeren Zellwand gebunden wird, nicht aufrecht erhalten werden. Auch JENSSEN und Mitarbeiter (54) konnten in ihren Untersuchungen zur Aufklärung der Ag-DNA-Komplexe zeigen, daß Silber in die Zelle eindringt und dort stabile Chelat-Komplexe mit DNA (Typ I und II) bildet, wobei die biologische Aktivität der DNA erhalten bleibt. Da der Abstand N - Ag - N mit 0,38 nm größer als der N - H···· N - Abstand (0,30 nm) ist, kommt es bei der Einschiebung von Silber zwischen die Basenpaare zu einer gewissen Verkrümmung und Verzerrung der "Watson-Crick"-Struktur.

Mögliche Struktur der Ag - DNA - Komplexe

Basenpaare: Adenin-Thymin



Als Beweis, daß durch die Silberbindung die Primärstruktur der DNA nicht bleibend verändert wird, zerstörten sie den Ag-DNA-Komplex durch Cyanid und maßen die UV-Adsorption. Es zeigte sich ein mit reiner DNA identisches Spektrum.
In der Arbeit von MODAK und FOX sollte der Wirkungsmechanismus von Silbersulfadiazin, das sich zur Behandlung von Brandwunden, insbes. solcher, die mit antibiotikaresistenten Keimen wie Pseudomonaden infiziert sind, in jüngster Zeit besonders bewährt hat, geklärt werden.
Mit Hilfe von $^{110}$ Ag und $^{35}$ S-Isotopen in Sulfadiazin (AgSD) konnte gezeigt werden:

1. AgSD dissoziiert im Kulturmedium und nur der Silberanteil wird in der Zelle gebunden
2. der antimikrobielle Effekt von AgSD ist der gleiche wie der von Silbernitrat
3. Silber wird in beträchtlichen Mengen an DNA gebunden. Die Affinität von Silber zu DNA ist 10mal größer als diejenige zu den Polysacchariden und Proteinen des Zellrestes und 40mal größer als zu RNA.
4. Silber wird entlang der Doppelhelix gebunden. Die Ag-DNA Bindung zeigt einen Anstieg und Abfall innerhalb von ca. 20 Stunden. Innerhalb dieser Zeit wurde die höchste Bindung während der logarithmischen Wachstumsphase sowie während der Phase der Keimschädigung gefunden. Das heißt, in Phasen vermehrter Zellteilung wird auch die höchste Silbermenge adsorbiert. Eine wachstumshemmende Wirkung tritt demnach erst ein, wenn genügend viele Basenpaare entlang der Doppelhelix gebunden werden.

Letztlich entscheidend für eine bakteriostatische oder eine bakterizide Wirkung ist die Menge an gebundenem Silber. Auch andere Autoren fanden bei Keimtötungsversuchen mit Silber Unterschiede im Verlauf der logarithmischen Absterbekurven. Kleine Silbermengen (50 µg/l) ergaben gekrümmte Linien, erst bei höheren Silberkonzentrationen verlief die Absterbekurve im halblogarithmischen Netz linear, womit dann eine bakterizide Wirkung des Silbers angenommen werden kann (82, 129).

5. Silberproteinkomplexe zeigen reversibles Verhalten, ein Verhalten, das sowohl im biologischen wie auch im chemischen Versuch nachgewiesen wurde. Das Wachstum beginnt, wenn die Konzentration an Ag-DNA-Komplexen unter einen bestimmten Wert gefallen ist. Wenn an 80 Basenpaaren nur noch 1 Atom Ag gebunden ist, wird eine erneute Keimvermehrung beobachtet. Die Autoren schließen aus ihren Untersuchungsergebnissen, daß als möglicher Wirkungsmechanismus, der den An- und Abstieg der Silberbindung an DNA erklären könnte, eine Verletzung der Zellwand mit nachfolgender Ausbesserung angenommen werden kann.

Die von vielen Autoren beschriebene größere Silberempfindlichkeit gramnegativer Bakterien gegenüber grampositiven ist vielleicht auf die unterschiedliche Dicke der Zellwand zurückzuführen. Gramnegative Bakterien haben nur eine dünne Mureinhülle von ca. 2 - 3 nm , während die festere Mureinhülle grampositiver Bakterien ca. 10 nm und ungefähr 50% der Gesamtzellmasse beträgt.

In einer 1974 von KULSKI und MOROTZ (62) in der UdSSR publizierten Arbeit über die Veränderung der Ultrastruktur von E. coli unter der Einwirkung von Silberelektrolytlösungen wird ein ähnlicher Wirkungsmechanismus wie von MODAK und FOX gefunden. Silberionen, die in einer Konzentration von 1-5 µg/ml (die Ag-Dosis ist höher als die bei oligodynamischen Versuchen eingesetzte) in eine E. coli-Kultur eingebracht wurden, bewirkten eine Plasmolyse der Zellen und eine Veränderung der Nucleotid-Struktur von E. coli-Zellen.

PFANKUCH und HAGENGUTH untersuchten 1942 polarographisch die Bindung von Schwermetallen an Proteine und Virusproteine und fanden eine wesentlich höhere Silberanreicherung im Tabakmosaikvirus, dessen Gehalt an Nucleoproteinen besonders hoch ist, als bei anderen Proteinen mit weniger Phosphor und Nucleotidgehalt.

3.7.4.1 Interkalation von Actinomycin und Platin: ein Vergleich mit Silber

Durch die Blockierung der DNS aufgrund einer Komplexierung mit Silber könnte ein ähnlicher Eingriff in die Nukleinsäure und Proteinsynthese angenommen werden, wie das für einige Antibiotica wie Mitomycin und Actinomycin nachgewiesen wurde. Actinomycin schiebt sich durch Interkalation in die Doppelhelix ein und verändert wahrscheinlich die Sekundärstruktur der DNA so, daß kein vollständiges DNA-Molekül mehr gebildet werden kann. Die Antitumorwirkung von Platinverbindungen wurde kürzlich von J.A. HOWLE et al. ursächlich als Pt-DNA-Bindung in Tumorzellen beschrieben (49).
Beweise für eine Parallelität der Wirkungsmechanismen auf Mikroorganismen zwischen oligodynamisch wirksamen Schwermetallionen wie Silber und denen mit DNA interkalierender Antibiotica und letztlich der erwähnten Platin-DNA-Bindung sind bis heute nicht erbracht worden.

3.7.5 Blockierung von Zellfermenten durch Silber

Silberionen werden außer von Nucleotiden auch von Fermenten und Metaboliten des Interzellularstoffwechsels, sowohl solchen mit als auch ohne Sulfhydrylgruppen gebunden. Bekanntlich sind fermentgebundene SH-Gruppen besonders gute Rezeptoren für Schwermetalle (39, 78, 82, 118, 126). Die antimikrobielle Wirkung von Quecksilberverbindungen resultiert auch im wesentlichen aus der Interferenz mit SH-Gruppen tragenden Enzymen des Zellstoffwechsels neben der Reaktion mit den Nucleinsäuren DNA und RNA (22). Die in Kap. 3.7.4 dargelegten

Untersuchungsergebnisse von MODAR, FOX und JENSSEN sowie diejenigen von YUDKIN (130) lassen die Schlußfolgerung zu, daß bei Silber in ppb-Mengen die Fermentinaktivierung nicht die letztlich entscheidende Reaktion in der Kette der zum Zelltod führenden Wechselwirkungen ist.
YUDKIN untersuchte die Fermentaktivität von vier E. coli-Dehydrogenasen unter Einwirkung unterschiedlichst hoher Silberkonzentrationen und fand erst bei höheren $Ag^+$ - Ionenkonzentrationen als $10^{-5}$ m/l (=1100 µg $Ag^+$ /l) eine Aktivitätsminderung, wohingegen bereits in einer $10^{-6}$ molaren $Ag_2SO_4$ - Lösung die gleichen E. coli-Stämme in einer Höhe von $\sim 10^9$ Keimen /l innerhalb von 30 Minuten abgetötet wurden.

### 3.7.6 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann angenommen werden:
Silbersalze können bakteriostatisch und bakterizid wirken. Niedrige Silberkonzentrationen wirken bakteriostatisch durch physikalische Adsorption des Silbers in der Zellwand. Höhere Silberkonzentrationen wirken bakterizid durch Penetration in die Zelle, Bindung an Desoxyribonucleinsäure und Reaktion mit Metaboliten und Enzymen des Zellstoffwechsels. Die Vermutung liegt nahe, daß der Zelltod bei oligodynamischen Silberkonzentrationen (d.h. $<10^{-5}$ m $Ag^+$ /l) in erster Linie durch die Silberbindung an DNS eintritt, denn die stabilsten $Ag^I$ - Komplexe werden mit P - und N - haltigen Liganden gebildet (siehe Kap. 3.8) .
Die für eine bakterizide Wirksamkeit notwendige Silberdosierung kann nur näherungsweise mit 50 µg $Ag^+$ /l angegeben werden. Sie kann bei ungünstigen Bedingungen um eine Zehnerpotenz höher liegen.
Wichtige Einflußgrößen auf die mikrobizide Wirksamkeit von Silber sind, wie schon teilweise erwähnt:
Das Keimspektrum, die Höhe der Keimeinsaat, die Temperatur, der pH-Wert, organische Komplexbildner (insbes. Makromoleküle), anorganische Salze, die mit Silber schwerlösliche Niederschläge bilden oder Silber durch Konkurrenz am Rezeptor

verdrängen.

### 3.8 Silberkomplexe mit Proteinen und Aminosäuren

PAULI und MATULA (89) haben bereits 1917 in einer Arbeit über Silbersalzproteine die Bindung von Silber an Proteine wie Glutin, Albumin und Casein mit Hilfe von Leitfähigkeitsmessungen nachgewiesen.
Silber wird von verschiedenen Proteinen und Aminosäuren in unterschiedlicher Menge gebunden (32).
Mit Aminosäuren bildet Silber kristalline $Ag^I$ - Komplexe, deren Stabilität mit steigender Kettenlänge zunimmt. In Abhängigkeit vom pH-Wert werden mit Monoaminocarbonsäuren $(HL)^1$ folgende Komplexstrukturen gebildet: $(Ag\ L)$, $(Ag\ L_2)^-$, $(AgOHL)^-$, $(Ag(HL)_2)^+$, $(AgHL)^+$ Komplexbildungskonstanten: $lg\ K_1$ = 3-4, 20 °C / $lg\ K_2$ : ca 4 , 20 °C .
Die Komplexbildung zwischen Silber und Proteinen nimmt mit steigendem pH-Wert zu (untersucht an Gelantine, Casein, Albumin). Im sauren pH-Bereich (pH 4-5) wird Silber nur an Carboxylgruppen gebunden, während im alkalischen Bereich (pH 8) Peptidgruppen (-NH-CO-) der Proteine zur Komplexierung dienen. Bei pH 10 werden z.B. mehr als 40 $Ag^+$ - Ionen/Mol Gelatine gebunden. $Ag^I$- Komplexe mit Aminen und der Koordinationszahl 2 sind wegen ihrer linearen Struktur sehr stabil.
Aus thermodynamischen Studien und Vergleichen der Stabilitätskonstanten entsprechender Komplexe wird als Reihenfolge für die relative Stabilität der Silber-Nichtmetall-Bindung angegeben:

$$P > N > S > Se > O\ .$$

Sauerstoff und Schwefel werden also schwächer koordiniert als Stickstoff und Phosphor.
In wässrigen Lösungen mit $Ag_2O$ wird erheblich mehr Silber an die genannten Proteine gebunden als in $AgNO_3$-Lösungen gleicher $Ag^+$ - Ionenkonzentration.
In Nitrat-Eiweiß-Lösungen zeigt Silber eine hohe Affinität zum Nitrat. Von LENZ und MARTELL (66) wurden mögliche Silber-Peptid-Nitrat-Chelate formuliert. Derartige Silberprotein-

[1] L = Ligand

komplexe sind reversibel.
Bei Zusatz von Alkali- und Erdalkaliionen wird komplex gebundenes Silber ausgetauscht und aus der Komplexbindung gedrängt.

## 3.9 Parallelitäten zwischen dem chemischen und biologischen Verhalten von Silbersalzen

Aus dem chemischen Verhalten von Silbersalzen gegenüber Proteinen lassen sich leicht Parallelitäten zu dem mikrobiologischen Verhalten finden.

a) Die zunehmende antimikrobielle Silberwirkung bei steigendem pH-Wert wurde von allen Autoren im mikrobiologischen Versuch bestätigt.
b) Bei oligodynamischen Versuchen mit $Ag_2O$ und sogenannten "aktivierten" Silberschichten (oberflächlich oxidiertes Silber) wurde die gute antimikrobielle Wirksamkeit gefunden. In zahlreichen eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß Testkeime in Silber und silberoxidbeschichteten Gefäßen besser abgetötet werden als in Silbernitrat-Lösungen mit gleicher freier Silberionenkonzentration.
c) Die hemmende Wirkung von Alkali- und Erdalkaliionen auf die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber wurde in zahlreichen Publikationen belegt.

## B. SPEZIELLER TEIL

### 4. Aufgabenstellung: Auswahl der Verfahren und Methoden

Bei den einleitend im allgemeinen Teil dieser Arbeit dargelegten Überlegungen wurde festgestellt, daß Silber in oligodynamischer Dosierung ein gegenüber den derzeit gebräuchlichen Augentropfenkonservantien wesentlich günstigeren therapeutischen Index besitzt.
An dieser Stelle kam es darauf an, eine ausreichende antimikrobielle Wirksamkeit von Silber und Silberverbindungen in wässrigen Ophthalmica nachzuweisen und alternative Möglichkeiten für ein elegantes und einfaches Einbringen einer geeigneten Silberwirkform in die Abgabegefäße zu finden.

#### 4.1 Herstellung von Abgabegefäßen mit antimikrobieller Wirksamkeit

Es waren Verfahren für die Herstellung einer neuen Verpackung von wässrigen Augenarzneien zu entwickeln, die einen Schutz vor Verunreinigungen nicht nur durch die Formgebungs- und Materialeigenschaft bieten, sondern die gleichzeitig antimikrobielle Eigenschaften besitzen.
Das Abgabegefäß sollte wie beschrieben ein Silberdepot enthalten, entweder als Überzug auf der Gefäßwand oder in Form eines einzulegenden Festkörpers, von deren Oberflächen Silberionen proliferierend in ppb-Mengen an die Lösung abgegeben werden.

#### 4.2 Mikrobiologische Prüfungen nach geltenden Standardmethoden

Die konservierenden Eigenschaften von Silbersalzen waren in Abhängigkeit von der $Ag^+$ - Ionen-Konzentration im mikrobiologischen Versuch zu prüfen, desgleichen diejenigen der oben angegebenen Abgabegefäße.

Die in zahlreichen Publikationen erwähnten Einflüsse anderer Substanzen auf die oligodynamische Silberwirkung sollten überprüft werden, insbesonders solcher Stoffe, die in den gebräuchlichsten Augentropfenformulierungen vorkommen.
Die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber in sog. "oligodynamischen" Mengen - d.h. Dosierung im ppb-Bereich - sollte in dieser Arbeit erstmals an Hand von Standardprüfmethoden in den jeweiligen Augentropfen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der nach den Vorschriften der USP XIX, mit einem erweiterten Testkeim-Spektrum, durchgeführten Konservierungsmittelbelastungstests sowie die Forderungen der "Interpharma-Arbeitsgruppe Mikrobiologie" galten als Beurteilungskriterien für die Eignung von Silber zur Konservierung von Augentropfen und evtl. anderen wässrigen Arzneiformen.

## 4.3 Silberanalytik im ppb-Bereich

Die Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit von Silber aus den verschiedenen schwerlöslichen Silberüberzügen waren in verschiedenen Trägerflüssigkeiten und Augentropfenformulierungen nachzuweisen. Außerdem wurde geprüft, ob eine Korrelation zwischen den in den Prüflösungen nachgewiesenen Silberionenkonzentrationen und der Keimtötungsrate und Keimtötungsgeschwindigkeit von Testkeimen in den gleichen Lösungen bestand.

## 4.4 Adsorptions- und Komplexierungsverhalten von Silber

Weiterhin galt es zu prüfen, in welchem Ausmaß Silberionen von der Masse der Bakterien, von Substanzen der Formulierung oder durch das Gefäßmaterial gebunden wurden. Dabei waren insbesondere Veränderungen in den Absterberaten der verschiedenen Testkeime durch konkurrierende Silberabsorption zwischen diesen und anderen anwesenden Substanzen zu untersuchen.

## 5. Silber-Depots in Augentropfgläsern: Material und Methoden

### 5.1 Silberhalogenide: Überzugs- und Fällungsverfahren, Schmelzen

AgCl und AgBr lassen sich als einzige Silbersalze leicht schmelzen und geben aufgrund ihrer Lösungscharakteristik Silberionen in oligodynamischen Mengen ab. Ihre erkalteten Schmelzen sind plastisch verformbar

AgCl: Schmp. 455 °C
AgBr: " 434 °C

Hergestellt und geprüft wurden: AgCl- und AgBr-Formlinge, die als lose Körper in die Augentropfenflaschen eingelegt werden können, sowie AgCl-Ringe, die fest in die Tropfpipetten der Gefäße eingesetzt wurden.

#### 5.1.1 Silberchlorid-Stangen (1 mm x 5 mm)

AgCl wurde in einem Porzellantiegel geschmolzen und in Schmelzpunktsröhrchen durch Kapillarsog aufgenommen. Das Glas wurde nach dem Erkalten von der erstarrten Schmelze abgeschlagen. Die erhaltenen AgCl-Stangen ließen sich auf die gewünschte Länge von 5 - 10 mm schneiden.

#### 5.1.2 Überzüge aus erstarrten Schmelzen von AgCl und AgBr

1. Poröse Steine (Siedesteine)
   AgCl oder AgBr wurde in einem Porzellantiegel erhitzt, bis eine rote bis gelbbraune Schmelze von niedriger Viskosität erhalten wurde. Die Siedesteine wurden bis zur vollständigen Benetzung in die Schmelze eingelegt und auf einer Porzellanplatte erkalten gelassen. Die Schmelze hatte eine sehr hohe Oberflächenspannung mit extrem schlechten Benetzungseigenschaften. Daher waren die Überzüge nur auf Körpern mit sehr rauhen Oberflächen haftfest genug. Die überzogenen Steinchen können in das Abgabegefäß eingelegt werden.
2. Keramikringe und Glasringe mit AgCl
   Die Ringe haben einen äußeren Durchmesser von 9 mm und passen in die fest mit dem Glasgefäß verschraubbaren Pipetten von

Zentrop$^{R}$ -Augentropfgläsern der Firma Remy oder auch anderen Marken wie Retro$^{R}$ , Gemo$^{R}$ oder in die Kunststofftropfer der Firma Oberglas.[1] Die Ringe sollten fest in den Pipetten sitzen und die Funktion des Tropfers nicht behindern, d.h. möglichst dünn sein, sich aber trotzdem noch in geeigneter Weise mit AgCl überziehen lassen. Die geometrische Oberfläche sollte so groß sein, daß beim Kontakt mit dem Lösungsinhalt der Flaschen Silberionen in ppb-Mengen an die Lösung abgegeben werden können. Als Ergebnisse der verschiedensten Prüfungen können nach dem oben beschriebenen Verfahren mit AgCl überzogene Keramikringe in der abgebildeten Größe als eine günstige Lösung vorgestellt werden.

Ein geeignetes Überzugsverfahren von AgCl-Schmelzen auf Glasringe der gleichen Größe konnte nicht gefunden werden. Die Überzüge hafteten auch nach mechanischem oder chemischem Anrauhen der Oberfläche nicht zuverlässig genug. Bei den Keramikringen dagegen löste sich der Überzug in keinem Fall ab.

### 5.1.3 Glasfritten mit gefälltem AgCl

Als Alternative zu den auf Ringen aufgezogenen erstarrten Schmelzen wurde versucht, ein Depot von Silberchlorid in Form von Glasfritten herzustellen, deren Porosität so beschaffen sein mußte, daß Silberchlorid auf die äußere und innere Oberfläche gefällt werden und daraus in ppb-Mengen partikelfrei in Lösung gehen konnte.
Für die Versuche wurden G3-Fritten von ca. 3 mm Dicke mit ca. 3 mm Innen- und 9 mm Außendurchmesser verwendet, die sich wie die Ringe in Augentropfer einsetzen lassen.
Silberchlorid wurde aus 1 bis 4%iger $AgNO_3$ - Lsg. und 1%iger NaCl-Lsg. in die Poren der Fritten gefällt.
Der Mechanismus von AgCl-Fällungen ist komplex und schwer steuerbar (33). Die Art der Keimbildung hängt u.a. von der $Ag^+$ - Ionenkonzentration ab. Neue Keime bilden sich z.B. an Orten, deren Abstand von AgCl-Kristallen $\geq 6\,\mu m$ ist. Es ist

---

[1] auch die neuen Aponorm$^{R}$-Augentropfflaschen sind geeignet

schwierig, eine gute Haftung und eine gleichmäßige Verteilung des Silberchlorids auf der großen inneren Oberfläche zu erreichen, da die Poren durch das Fällungsprodukt rasch verstopft werden. Fritten mit kleineren und größeren Poren waren ungeeignet.
Die Fritten wurden nach dem Reinigen in Salpetersäure mit $AgNO_3$ - Lösung vollständig getränkt, getrocknet, die Oberfläche vorsichtig mit Wasser gespült und in gleicher Weise mit Natriumchloridlösung durchfeuchtet. Nach dem Trocknen wurde gründlich gewässert. Die Entlüftung der Fritten durch Unterdruck sowie die Sättigung mit $AgNO_3$ und NaCl-Lösung wurde in einem Membranfiltrationsgerät aus Makrolon vorgenommen (Sartorius SM 16510).
Bei dem genannten Fällungsverfahren zersetzten sich die Silbersalze unter Dunkelfärbung zum Teil. Die aus den Fritten an die Lösung abgegebene Silberionenmenge wird durch diese Art der Zersetzung nicht nachteilig beeinflußt.
Die präparierten Fritten werden hier nur als eine Möglichkeit oder Anregung dargestellt, die noch der Ausreifung bedarf. Da vorteilhaftere Lösungen gefunden werden konnten, wurde nicht weiter nach einer Optimierung des Verfahrens gesucht.

## 5.2 Silberüberzüge durch Reduktionsversilberung

### 5.2.1 Kunststoffversilberung

Die Möglichkeit der Kunststoffversilberung ist in den letzten Jahren durch die großen Erfolge bei der Weiterentwicklung der Galvanotechnik und der Vakuumaufdampfungstechnik sehr vielgestaltig geworden. Als Beispiel sei hier nur die Galvanisierung von ABS-Pfropfpolymerisaten genannt, mit deren Hilfe sich in großtechnischem Maßstab heute Gebrauchsgegenstände mit außerordentlich strapazierfähigen Silberüberzügen herstellen lassen (Armaturen, Autozierleisten, Uhrengehäuse usw.) (9).
Bei den Galvanisierungsverfahren für Kunststoffe werden Überzüge auf starren Kunststoffen hergestellt, deren Elastizität gering ist. Die Erzeugung sehr elastischer Silberüberzüge auf flexiblen Plastikmaterialien wird heute im galvanotechnischen Bereich noch nicht verfolgt. Hierfür ist wohl die Aufdampfungs-

technik das Verfahren der Wahl. Beide Techniken sind ungeeignet, wenn man allein die innere Oberfläche der Plastiktropfer versilbern will, da neben der inneren auch immer die äußere Oberfläche mitversilbert wird.
Daher habe ich versucht, in Anlehnung an die Flachglasversilberung eine geeignete stromlose Reduktionsmethode zu finden, mit deren Hilfe sich Silberüberzüge auf Polypropylen- und Polyethylentropfern herstellen lassen, welche die gestellten Anforderungen an Elastizität, Haftfestigkeit und v.a. Silberabgabe an die Lösung in hinreichendem Maße erfüllen. Einen besonderen Stellenwert bei der Beurteilung des Überzuges muß im Hinblick auf häufiges Zusammendrücken des Plastiktropfers bei Gebrauch und im Hinblick auf den Kontakt mit den verschiedenen Salzlösungen seiner Haftung eingeräumt werden. Brauchbare Ergebnisse ließen sich durch Vorbehandeln des Polypropylens mit Hilfe von Dichromat-Schwefelsäure (anrauhen) und Zinn(II)-chlorid (aktivieren) erzielen ( 45, 46, 79, 115).
Alle stromlosen Silberreduktionsverfahren kranken an zwei Gegebenheiten:

1. die schnelle Zersetzlichkeit der Reduktionsbäder
2. die unterschiedliche Keimbildung in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit und dem Einfluß von Fremdionen im Reduktionsbad.

Bei den eigenen Laborversuchen ließ sich feststellen, daß die Haftfestigkeit verbessert wird, wenn Spuren von Aktivkohle sowie Argentum colloidale dem Reduktionsbad zugesetzt werden. Zudem haben diese Substanzen Katalysatoreigenschaften, so daß durch sie die Geschwindigkeit der Keimbildung erhöht und somit ein gleichmäßiger Überzug erhalten wird, der durch eine sehr geringe Schichtdicke an Elastizität gewinnt.

5.2.1.1 Versilberung der inneren Oberfläche von Polypropylen-Tropfpipetten (Stella$^{R}$ )

Methode:

1. Anrauhen

Reagenz-Lsg.: 25 g $K_2 Cr_2 O_7$ , 60 g $H_2 SO_4$ , 30 g $H_2 O$

Die Tropfer werden an den Spitzen mit Parafilm $^{R}$ verschlossen und mit Dichromat-Schwefelsäure gefüllt.
Einwirkungszeit: 24 Stunden
Dann gründlich spülen.

2. Aktivieren
Reagenz-Lsg.: 20 g $SnCl_2$ in 100 ml HCl 25%
Zinn (II)-chlorid-Reagenz in die Tropfer füllen
Einwirkungszeit: 1 Minute
Dann gründlich spülen.

3. Versilbern
Reagenz-Lsg.: a) Silberdiamminnitrat-Lösung
6 g $AgNO_3$ in 100 ml $H_2O$ lösen, langsam 25%ige Ammoniak-Lösung zusetzen, bis der Niederschlag sich gerade löst.
pH: 8 - 9 .
Katalysatoren: einige Tropfen einer sehr verdünnten Lösung von Argentum colloidale oder eine Spur Aktivkohle.
b) Reduktionslösung
7 ml Formaldehydlösung zu 100 ml verdünnen.
Die auf 60 bis 70 °C erwärmten Reagenzlösungen a) und b) werden getrennt aus zwei Kunststoffspritzen in dünnem Strahl in die Stella-Pipetten gespritzt, so daß sich die Lösungen sofort vermischen können. Der Silberspiegel bildet sich sofort. Zersetzung des Bades nach ca. 60 Sekunden. Danach gründlich spülen.

4. Trocknen
Trocknungstemperatur: 50 °C einige Stunden, dann 100 - 120 °C 2 - 3 Stunden (härten).
Die Temperatur muß langsam gesteigert werden, sonst wird der Belag rissig.

5. Oxidation des Silberüberzugs (Aktivieren)
Reagenz-Lsg.: $H_2O_2$ - Lösung 10%
Nach dem Aushärten des Überzugs füllt man die Pipette mit der Wasserstoffperoxidlösung und läßt 1 - 2 Minuten bis zur deutlichen Blasenbildung einwirken.
Danach gründlich spülen.
Bei längerer Behandlung mit $H_2O_2$ löst sich der Silberüberzug vom Plastik ab.

.2.2 Versilberung der Glasgefäße

ach dem Reduktionsverfahren hergestellte Silberspiegel haften
uf Glasoberflächen nur ungenügend. Daher habe ich versucht,
n Anlehnung an die üblichen Siliconisierungsverfahren von
läsern den Silberspiegel in einem siliconhaltigen Reduktions-
emisch zu erzeugen. Der Belag ließ sich bei 250 °C einbrennen.
ach folgendem Verfahren konnten außerordentlich haftfeste
berzüge hergestellt werden:
inem nach den üblichen Methoden zur Herstellung von Spiegel-
las bereiteten Reduktionsgemisch, bestehend aus: 0,5%iger
g$NO_3$ - Lösung, ammoniakalisch, pH 8, und 1 Teil Glucose-Lsg. 5%-
igwurde 2% Silicon-Emulsion G (Goldschmidt) zugesetzt.
ach Reduktion (15 bis 20 Minuten in der Kälte) wurden die
laschen gut auslaufen gelassen.
ärtung des Silberbelags: 2 Stunden bei 250 °C
ktivierung der Oberfläche: durch Oxidation mit $H_2O_2$ wie
eschrieben (5.2.1.1 ).
anach mehrmals sorgfältig mit Wasser spülen.
m mikrobiologischen Versuch erwiesen sich die so behandelten
laschen als gut mikrobizid wirksam gegenüber E. coli und
seud. aer. ATCC.
eitere Versuche mit diesen Flaschen wurden nicht durchgeführt.

.3 Zusammenfassung

on den hier beschriebenen Vorschlägen zur Darstellung schwer
öslicher Silberformen, die in Augentropfflaschen durch Pro-
iferation von Silberionen die Keimfreiheit während des Ge-
rauchs bewahren sollen, wurden die unter5.1.2 und 5.2.1.1
argestellten Verfahren als die für die Praxis geeignetsten
ehalten. Für die nachfolgend beschriebenen mikrobiologischen
nd analytischen Prüfungen wurden deshalb vorrangig Prüfgefäße
erwendet, denen mit Silberchlorid überzogene Keramikringe
ingesetzt wurden, und solche mit versilberten Plastiktropfern
Stella $^R$).

6. Beständigkeit des Überzugs

Sterilisationsverfahren: Dampfsterilisation: 121 °C, 2 bar
Gassterilisation : Ethylenoxid

Zahl der geprüften Muster: ~ 100

Ergebnis: alle Muster blieben unverändert.

Elektrolytlösungen und Augentropfen unterschiedlicher Komposition:

Zahl der geprüften Muster: ~ 200

Lagerzeit: 1 - 12 Monate

Ergebnis: Der Silberüberzug haftete beim Kontakt mit den unterschiedlichen Formulierungen während des Lagerzeitraums von mehreren Monaten gut. Für die Elastizitätsprüfung des Silberbelages wurden die Plastiktropfer dabei wiederholt durch Zusammendrücken verformt. Nur in einigen Fällen blätterte der Belag in Gegenwart von isotonischer NaCl-Lösung ab. Um eine sichere Haftung des Silberbelages auch bei längerem Kontakt mit Lösungen, die Natriumchlorid als Isotoniezusatz enthalten, zu gewährleisten, müßte das Überzugsverfahren in dieser Richtung optimiert werden.

Es ist allerdings anzunehmen, daß sich ein derartiges Verfahren für Silberüberzüge ohne Oberflächenisolierung nur schwer finden läßt, da z.B. 10%ige heiße NaCl-Lösungen die besten Lösungseigenschaften gegenüber Silberrückständen an Gefäßwänden haben.

Eine Lösungsmöglichkeit wäre bei der Naßversilberung lediglich in der Verringerung der Schichtdicke durch Steuerung der Keimbildung oder in der Vakuumaufdampfungstechnik zu suchen. Nach eigenen Beobachtungen blätterte Silber nur von Tropfern mit dickerer Belagsschicht ab, die ohne die erwähnten Katalysatoren aufgebracht wurden.

7. Silbergehalt des Überzugs

Der Silberüberzug wurde mit Salpetersäure von der Plastikoberfläche gelöst und der $Ag^+$ - Gehalt potentiometrisch mit Hilfe einer ionenspezifischen Elektrode bestimmt (Kap. 7 ).

Folgende Silbermengen wurden gefunden:

114 mg, 65 mg, 37 mg, 216 mg, 117 mg.

## 6 Mikrobiologische Prüfungen

### 6.1 Material und Methoden

#### 6.1.1 Nährmedien

| Trockennährböden und -bouillons (Merck) | Art. Nr. |
|---|---|
| I CASO Agar = Casein-Sojamehlpepton-Agar | 5458 |
| II Mac-Conkey Agar | 5465 |
| III Sabouraud-Maltose Agar | 5439 |
| IV CSB-Bouillon = Casein-Sojamehlpepton-Bouillon | 5459 |
| V Sabouraud-Maltose-Bouillon | 5399 |
| VI Thioglycolat-Bouillon | 8190 |

##### 6.1.1.1 Wachstumskontrollen

Die frisch bereiteten Nährmedien wurden chargenweise nach den üblichen mikrobiologischen Verfahren auf ihre Eignung geprüft: durch Beimpfen mit verdünnten Suspensionen frisch gewachsener Stämme der verwendeten Testkeime.

#### 6.1.2 Testkeime

Vorrangig wurden die in der USP XIX unter dem Kapitel "Microbiological Tests" angegebenen ATCC-Stämme benutzt (117).

1. Escherichia coli ATCC No 8739
2. Pseudomonas aeroginosa ATCC No 9027
3. Staphylococcus aureus ATCC No 6538
4. Candida albicans ATCC No 10231
5. Aspergillus oryzae[4]

Außer den Teststämmen der USP XIX wurden zusätzlich zwei Sporenbildner eingesetzt:

6. Bacillus cereus ATCC No 9634 und
7. Bacillus subtilis ATCC No 6633.

Daneben wurden auch andere Stämme der Keimarten 1 - 4 getestet.
Escherichia coli: 4 Stämme (Dispepsi, 0273, 51171, 0206)
Pseudomonas aeruginosa: 4 Stämme (0363, 1450, 4569, 3594)
Staphylococcus aureus: 4 Stämme (SG 511, 0124, 4, 5)

[4] anstelle von Aspergillus niger ATCC, der wegen seiner Pathogenität nicht verwendet wird (entsprechend Testverfahren der P.-Mikrobiologie, Boehringer, Mannheim)

Candida albicans: 3 Stämme (Tropicans, Kruse, Marburg)

6.1.3 Keimsuspension

Bakterien
Keimanzucht: 1.) 18 - 20 Stunden in CSB-Bouillon
danach: 2.) 24 Stunden auf CASO-Agar
[E. coli 24 Stunden auf Mac-ConKey Agar]
Bebrütungstemperatur: 32 - 35 °C
Die gewachsenen Keime werden mit isotonischer Phosphat-NaCl-Pufferlösung pH 7,2 abgespült, abzentrifugiert, gewaschen und auf die gewünschte Keimdichte von ca. $10^8$ Keimen/ml[1] eingestellt. Zum Homogenisieren diente ein Vibro-Mixer.
Zur Ermittlung der Keimdichte diente ein Trübungsmeßvergleich bei 623 nm gegen eine Eichkurve, die im Extinktionsintervall von $E_{\lambda 623}$ = 0,300 - 0,600 linear verläuft.
Zur Kontrolle wurde die Keimdichte nach dem Plattenzählverfahren bestimmt.
Von der so gewonnenen Keimsuspension wurden noch am gleichen Tag 0,2 ml in 20 ml der Prüflösung inoculiert (117).

Candida und Aspergillus
Keimanzucht: 1.) 2 - 3 (5) Tage[2] in Sabouraud-Maltose Bouillon
danach 2.) 2 - 3 (7) Tage[2] auf Sabouraud-Maltose Agar
Bebrütungstemperatur: 20 - 25 °C
Die gewachsenen Keime wurden mit isotonischer NaCl-Lösung abgespült, bei Aspergillus unter Zusatz von 0,1% Tween 80.
Weiter wird wie unter "Bakterien" angegeben verfahren.
Von Aspergillus oryzae wird eine vorwiegend aus Sporen bestehende Suspension gewonnen, deren Keimdichte wegen ungenügender Abschwemmbarkeit vom Nährboden kaum auf die gewünschte Keimdichte gebracht werden konnte.

---

[1] mit isotonischer Pufferlösung oder mit dest. Wasser (s. Versuchsbedingungen)

[2] Die in Klammer angegebenen Zahlen betreffen Aspergillus oryzae

6.1.4 Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

6.1.4.1 Untersuchung der Substanzen auf antimikrobielle Eigenaktivität (12) (60) (117)

Zur Bestimmung der Wirksamkeit der Nährmedien in Gegenwart der zu prüfenden Lösungen wurden mit jeweils 2 Bakterienstämmen der USP XIX Testkeime und Candida albicans Wachstumskontrollen durchgeführt. Dabei wurde nach den üblichen Methoden der mikrobiologischen Analytik und den Angaben der Pharmakopoen verfahren und die Kolonienzahl bei 2 Positivkontrollen (Nährmedium + Prüflösung) mit 2 Negativkontrollen (Nährmedium ohne Prüflösung) verglichen.

6.1.4.2 Ausschalten der antimikrobiellen Eigenaktivität

Bei nachgewiesener antimikrobieller Wirksamkeit der zu prüfenden Substanzen wurde diese durch eine der üblichen Methoden wie Inaktivierung, Verdünnung oder Filtration über Membranfilter und Auswaschen ausgeschaltet. Bei allen gesilberten Prüflösungen wurde die Silberaktivität durch Inaktivierung mit Na-Thioglykolat ausgeschaltet.

1. Na-Thioglykolat 0,25% als Zusatz zum Nährmedium
2. " 0,25% in die erste Verdünnungsstufe der zu prüfenden Lösung
3. Thioglykolat-Nährmedium.

Von den in dieser Arbeit geprüften Substanzen wurde eine antimikrobielle Eigenaktivität in der Prüfkonzentration nachgewiesen bei:
Tetracain-HCl (Inaktivierung "Recovery medium" (80) aus: CASO-Agar bzw. Sab.-Maltose-Agar unter Zusatz von 3% Tween 80 + 0,2% Lecithin + 0,1% Na-Thioglykolat)
Targesin und Ethylmorphin-HCl (Inaktivierung: Verdünnen oder Membranfiltermethode).
Chlorhexidinacetat und Phenylquecksilbernitrat (Inaktivierung: Membranfiltermethode). Borsäure hat zwar auch antimikrobielle Eigenschaften, wirkt aber in der geprüften Konzentration, wie die Versuche ergaben, nicht wachstumshemmend. Die Wirksamkeit

der Inaktivierungsmethoden wurde überprüft.

6.1.5 Durchführung : Konservierungsmittelbelastungstest
6.1.5.1 Keimgehalt (117) (number of colony-forming units per ml)

Die Prüflösungen wurden je nach den zu erwartenden Keimgehalten mit isotonischer Phosphat-Pufferlösung (pH 7,2) in Zehnerpotenzen verdünnt.

0,5 ml Prüflösung + 4,5 ml Pufferlösung.

Die Prüflösung sowie jede Verdünnungsstufe wurden 30 s mit einem Vibro-Mixer homogenisiert. Von jeder Verdünnungsstufe wurde die Kolonienzahl mittels Plattengußmethode bestimmt. Von den letzten beiden Verdünnungsstufen wurden je 2 - 3 Platten angesetzt. In einigen Lösungen mit den o.a. antimikrobiell wirksamen Substanzen wurde der Keimgehalt mit Hilfe der Membranfiltermethode bestimmt.
Bebrütungszeit: Bakterien: 3 - 4 Tage; Temp. 32 - 35 °C
Candida + Aspergillus 1 Woche; Temp. 20 - 25 °C
Auswertung: (60) (11 a )
Die Ergebnisse des Plattenzählverfahrens werden angegeben als:
Keime pro ml Prüflösung = K/ml = Kolonienzahl pro ml Prüflösung

$$K_{/ml} = \frac{\text{Summe der Kolonienzahlen}}{\text{Summe der ausgewerteten Platten x Prüfvolumen}}$$

mathematisch gefaßt:

$$K_{/ml} = \frac{\sum C_i}{\sum n_i \cdot z_i}$$

$z_1, z_2, \ldots z_i$ .. verwendete Verdünnungen (Volumen)
$n_1, n_2, \ldots n_i$ .. die Anzahl der beimpften Platten
$C_1, C_2, \ldots C_i$ .. Anzahl der bei den einzelnen Verdünnungen insgesamt gezählten Kolonien

Erfassungsgrenze: 10 Keime/ml (bei den angeführten Versuchsbedingungen und zusätzlicher Prüfung nach 6.1.5.2)

Unter der Annahme einer Poisson-Verteilung wurden die auf den einzelnen Platten ausgezählten Kolonienzahlen einer Verdünnungsstufe auf ihre Variabilität geprüft. Der Signifikanztest wurde

nach der $\chi^2$ - Methode durchgeführt.
(Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha$ = 5%)
Die zuverlässigsten Werte liefern Platten, die mit ca. 100 - 300 Kolonien bewachsen sind. Sie wurden in erster Linie zur Bestimmung der Koloniezahl herangezogen.
Die in den Tabellen als K/ml aufgeführten Zahlenwerte sind die geschätzten Mittelwerte der Mikroorganismenzahl in 1 ml der Prüflösung zur angegebenen Zeit. Der wahre Mittelwert (M) errechnet sich unter Berücksichtigung des Standardfehlers (S) und einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha$ = 5% bei

$$S_{K/ml} = \sqrt{\frac{K/ml}{n_i \cdot Z_i}} \qquad \text{als: } M = K/ml \pm (1{,}96 \cdot S)$$

Die angegebene Keimzahl/ml ist also um den Faktor (1,96 . S) nach oben und unten zu erweitern.

6.1.5.2 Keimwachstum in flüssigen Nährmedien

Prüfungen auf vermehrungsfähige Keime in flüssigen Nährmedien wurden bei niedrigem Keimgehalt durchgeführt, wenn sich auf festen Nährböden kein Keimwachstum nachweisen ließ.
Bei einem Konservierungsmittelbelastungstest nach USP XIX - Richtlinien reicht die Erfassungsgrenze der Plattengußmethode für die richtige Interpretation der Ergebnisse aus, da 0,1% überlebende Keime zugelassen werden, das sind $10^2$ - $10^3$ Keime/ml bei einer Keimeinsaat von $10^5$ - $10^6$ Keimen/ml.
Im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings alle Prüflösungen ggf. auf überlebende Keime in Nährbouillon wie folgt geprüft:

0,2 - 0,5 ml Prüflösung in 10 ml Nährbouillon (3Proben)
Bebrütungszeit: 1 - 2 Wochen
Temperatur: 32 - 35 °C Bakterien
20 - 25 °C Pilze und Hefen.

Versuche zur Prüfung der Empfindlichkeit verschiedener Keime gegenüber unterschiedlichen $Ag^+$ - Ionenkonzentrationen ($AgNO_3$ - Lösungen) wurden nach der unter 6.2 beschriebenen Testmethode zur Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln der

DGHM, modifiziert nach REYBROUCK, durchgeführt (91).

### 6.1.6 Prüflösungen

#### 6.1.6.1 Herstellung

Die Lösungen wurden nach den anerkannten Vorschriften zur Herstellung wässriger Augenarzneien bereitet und je nach Eignung und Aufgabenstellung auf drei verschiedene Arten entkeimt.

1. Dampfsterilisation im Abgabegefäß bei 120 °C, 2 bar
2. Dampfsterilisation der Lösung bei 120 °C, dann unter Vermeidung von Kontamination in sterilisierte Gefäße abgefüllt.
3. Sterilfiltration über Membranfilter in sterilisierte Gefäße.

#### 6.1.6.2 Gefäße

Bei allen Untersuchungen, die als Konservierungsmittelbelastungstest nach den Richtlinien der USP XIX durchgeführt wurden, dienten Augentropfflaschen mit 20 ml Inhalt und festverschraubbarem Tropfer als Aufbewahrungsgefäße.

1. Zentrop $^{R}$-Augentropfgläser mit einer Einlage aus Silberchlorid oder -bromid (5.1)
2. Stella $^{R}$-Augentropfgläser mit versilberten Plastiktropfern (5.2)
3. Augentropfgläser der Sorten 1. und 2. ohne Silber (Kontrolllösungen).

#### 6.1.6.3 Keimeinsaat

Die Prüfkeime wurden erst inoculiert, nachdem die Prüflösung mindestens 24 Stunden in einem der unter 6.1.6.2 angegebenen Aufbewahrungsgefäße gelagert war. Damit Silberionen in Lösung gehen können, wurden die Flaschen bis zur Keimeinsaat liegend oder kopfstehend gelagert.

Von den nach 6.1.3 bereiteten Keimsuspensionen wurden - jede Keimart für sich - 0,2 ml in 20 ml Prüflösung inoculiert. Bei einigen Serien wurden Mischsuspensionen, sowohl verschiedener Keimarten als auch solche verschiedener Stämme einer Keimart, inoculiert.
Die USP XIX läßt nur Prufungen mit einzelnen Stämmen durchführen. Bei allen Versuchen wurde von jeder Formulierung ein Negativmuster als Kontrollösung ohne Silber mitgeführt und in gleicher Weise behandelt.

6.1.6.4 Lagerung und Kontrolle auf Keimgehalt

Die Prüflösungen wurden bei Raumtemperatur gelagert. Dadurch ergaben sich Temperaturschwankungen von ca. $\pm$ 10 $^{o}$C, also Versuchsbedingungen, die den Gegebenheiten der Praxis nahekommen. Die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber ist stark temperaturabhängig (3.5.4). Schwankende Ergebnisse bei den Keimtötungsversuchen verschiedener Serien erklären sich somit u.a. aus den Temperaturdifferenzen bei der Lagerung.
Die Prüfgefäße wurden entweder in Intervallen oder während der gesamten Prüfdauer kopfstehend gelagert, um die Abgabe von Silberionen aus den schwerlöslichen Verbindungen in die Prüflösung zu ermöglichen. Der Keimgehalt der Prüf- und Vergleichslösungen wurde nach Ablauf der jeweils angegebenen Lagerzeiten nach 6.1.5 mit einer Prüfmenge von 0,1 - 0,5 ml bestimmt. Die Lagerzeiten betrugen in der Regel 1, 3, 7, 14, 21 und 28 Tage. Das Ergebnis der Keimzahlbestimmungen wurde tabellarisch und graphisch dokumentiert. Die Absterberate wurde im semi-logarithmischen Netz als Zahl der überlebenden Keime/ml oder als Prozent überlebende Keime/ml dargestellt.
Als Beurteilungskriterien für ausreichende Konservierung werden diskutiert:
1. Die Richtlinien der USP XIX
2. Die Richtlinien der Interpharma-Arbeitsgruppe Mikrobiologie (2.2.3.1).

6.1.7 Minimale Hemmkonzentrationen von $Ag^+$ - Ionen im Suspensionsversuch. Testmethode zur Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln der DGHM - modifiziert nach REYBROUCK (91-93)

Mit Hilfe der zitierten Methode wurde die Silberempfindlichkeit von ATCC-Stämmen und anderen Stämmen orientierend geprüft. Parallel zu den Suspensionsversuchen wurden zusätzlich Plattenkulturen angelegt und die Absterberate nach 7 und 14 Tagen ermittelt.

Keimanzucht:

Eine Oese der Stammkulturen wurde in je 10 ml Casein-Sojamehl-Pepton Bouillon (CSB-Bouillon, Merck) überimpft und 24 Stunden bebrütet.

Bakterien bei 35 - 37 °C, Cand. alb. bei 30 °C.

Je 0,5 ml der frisch gewachsenen Bouillonkulturen wurden wiederum in 10 ml CSB-Bouillon überimpft und 24 Stunden bebrütet. Die Keime wurden scharf abzentrifugiert und in Wasser suspendiert.

Die Keimsuspension wurde mit Wasser bis zu einer Keimdichte von ca. $10^8$ K/ml bei Bakterien und ca. $10^7$ K/ml bei Cand. verdünnt. Von der so gewonnenen Keimsuspension wurde die Koloniezahl mittels Oberflächenkultur bestimmt.

0,1 - 0,2 ml Keimsuspension werden in 10 - 20 ml $AgNO_3$-Lösungen mit $Ag^+$ - Gehalt variierend von 5 - 1000 µg/l inoculiert, denen zum Teil makromolekulare Hilfsstoffe zugesetzt wurden.

Die Prüflösungen wurden durch Sterilfiltration über Membranfilter entkeimt und bei Raumtemperatur vor Licht geschützt gelagert.

Nach Einwirkungszeiten von 6 Stunden bis 5 Tagen werden je 0,1 - 0,2 ml der Prüflösungen in 10 ml CSB-Bouillon (oder Thioglykolat-Bouillon) geimpft und 3 Tage bebrütet. Das Keimwachstum wird an der Trübung der Bouillon erkannt. Als Enthemmungsmittel wird bei CSB-Bouillon 0,25% Na-Thioglycolat zugesetzt. Von jeweils der ersten getrübten Nährbouillon und der letzten unbewachsenen klaren wird eine Plattenkultur angelegt und auf Keimidentität geprüft. Von allen getrübten Bouillons

ließen sich Keime im Plattentest anzüchten. Bei keinem der klaren Röhrchen war ein Keimwachstum nachweisbar.
Abweichend von der Prüfmethodik der DGHM wurden statt 1 Subkultur jeweils 3 - 5 Subkulturen angelegt. Die Wahrscheinlichkeit einer falschen Aussage liegt bei Verwendung nur einer einzigen Subkultur bei ca. 20% (93).
Außerdem halte ich den Suspensionstest der DGHM zur Bestimmung der M H K, bei dem ja die mikrobizide Wirksamkeit einer Substanz in Gegenwart der Nährbouillon geprüft wird, für wenig geeignet für die Prüfung der Silberwirkung, da die Silberionen bekanntlich durch die Proteine des Nährmediums inaktiviert werden. Daher wurde diese modifizierte Testmethode gewählt[1]. Die Keimsuspension wurde in Wasser hergestellt anstelle von Nährbouillon, um das Einbringen von Fremdstoffen (bes. Eiweiß)in die Prüflösung zu vermeiden. Die Höhe der Keimeinsaat in die Prüflösung wurde entsprechend der Methode zur Prüfung von Konservierungsstoffen der USP XIX gewählt (Antimicrobial-preservatives-effectiviness). Die Versuche wurden in Reagenzgläsern durchgeführt und im Vibrationsmixer geschüttelt.

Zur Abkürzung der Versuche wurden die Konzentrationen der Prüflösungen nicht in geometrischer Reihe gesteigert.
Die Überlebensfähigkeit der Keime in einer in gleicher Weise behandelten Kontrollösung wurde während der gesamten Versuchsdauer überprüft.
Die keimtötende Wirkung von $Ag^+$-Ionen wird ausgedrückt als:
1. Zahl der bewachsenen Röhrchen/Gesamtzahl der Röhrchen
2. Extinktion = Verhältnis unbewachsener Röhrchen/Gesamtzahl der Röhrchen

Extinktion = 1,0 bedeutet, daß keine vermehrungsfähigen Keime mehr nachweisbar sind.
Diese Prüfung ist gegenüber der Bestimmung der Absterberate von 99,9% nach USP XIX als strenger anzusehen. Die Ergebnisse der beiden Methoden lassen sich nur bedingt vergleichen.

---

[1] nach der die keimschädigende Wirkung einer Substanz in Abwesenheit eines der Keimanzucht dienenden Nährmediums geprüft wird.

6.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Prüfungen

6.2.1 Silberempfindlichkeit verschiedener Keime

**Keimtötende Wirkung von Silberionen in verschiedenen Lösungen (als Silbernitrat).**

**6.2.1.1 Suspensionstest der DGHM - modifiziert nach REYBROUCK Zur Prüfung der Silberempfindlichkeit (annährend M H K )**

**Die Ergebnisse wurden wie in Kap. 6.1.7 beschrieben ausgedrückt als:**
**Zahl der bewachsenen Röhrchen (+) und der unbewachsenen Röhrchen (-) sowie als Extinktion.**

Versuchsreihe 1

| Testkeime | | No | Höhe der Keimeinsaat |
|---|---|---|---|
| Staph. aureus | ATCC | 6538 | $3 \cdot 10^6$ K/ml Prüflösung |
| Pseud. aer. | ATCC | 9027 | $3{,}3 \cdot 10^6$ K/ml Prüflösung |
| Cand. alb. | ATCC | 10231 | $4 \cdot 10^4$ K/ml Prüflösung |
| E. coli | ATCC | 8739 | $8 \cdot 10^5$ K/ml Prüflösung |

Keimsuspension in Wasser: 0,1 ml/10,o ml Prüflösung
Prüfungszeitraum: 5 Tage/Raumtemperatur/Lichtschutz
$Ag^+$ - Konz./l (als $AgNO_3$) : 5 µg, 10 µg, 100 µg, 300 µg, 500 µg, 1000 µg
Hilfsstoffe: Phosphat als isotonische Pufferlösung + 0,1% Pepton
Wachstumskontrollen: 0,1 ml Prüflösung in 10 ml CSB-Bouillon
**nach den in der Tabelle 1 angegebenen Zeiten.**

Die Ergebnisse (Tab. 1)

Die Keimbelastung der Prüflösungen war bei Staph. aureus und Pseud. aer. besonders hoch (10 mal höher als nach USP XIX-Vorschrift). Jeder Stamm wurde in 5 Lösungen gleicher Komposition inoculiert.
In rein wässriger Lösung töteten $Ag^+$ - Ionen in einer Konz. von 100 µg/l innerhalb von 2 Tagen alle Testkeime ab.
$Ag^+$ 300 µg/l wirkten bereits nach 1 Tag keimtötend auf E. coli und Cand. alb.
$Ag^+$ 1000 µg/l töteten alle Testkeime innerhalb von 6 Stunden ab.

$Ag^+$ 500 µg/l in isotonischer NaCl-Phosphat-Pufferlösung + Pepton, pH 7,2, zeigten über die Versuchsdauer von 5 Tagen keinen keimtötenden Effekt im Suspensionsversuch.
Die vielfach zitierte hemmende Wirkung von Chloridionen und besonders von Eiweiß auf die mikrobizide Wirksamkeit von $Ag^+$-Ionen zeigte sich bestätigt.

Versuchsreihe 2

Keimtötende Wirkung von Silberionen (als $AgNO_3$) in Gegenwart makromolekularer Hilfsstoffe und Phosphat.
Als Testkeime wurden folgende ATCC-Stämme eingesetzt:

| Testkeime | No | Höhe der Keimeinsaat | |
|---|---|---|---|
| E. coli | 8739 | $1,2 \cdot 10^6$ K/ml Prüflsg. | (2 Versuchsserien) |
| Staph. aur. | 6538 | $5,5 \cdot 10^5$ K/ml Prüflsg. | |
| Bac. subt. | 6633 | $10^6$ K/ml Prüflsg. | |
| Bac. cereus | 9634 | $5 \cdot 10^4$ K/ml Prüflsg. | |
| Cand. alb. | 10231 | $3 \cdot 10^4$ K/ml Prüflsg. | |
| Bac. subt. | 6633 | $1,3 \cdot 10^6$ K/ml Prüflsg. | als Sporensuspension |

Keimsuspension in Wasser: 0,2 ml/20,0 ml Prüflösung.
Prüfgefäße: Zentrop-Augenbäder 20 ml/Raumtemperatur (Lichtschutz)
Prüfungszeitraum: 13 Tage
$Ag^+$ - Konz./l: 500 µg und 1000 µg
Hilfsstoffe: Polyvinylalkohol 1 % (PVA), Methylcellulose (0,5% Methocel$^R$ 1500)
isotonische Phosphat-Pufferlösung pH 6,8
Wachstumskontrolle: nach den Zeiten der Tabelle 2 wie bei der Versuchsreihe 1

Die Ergebnisse (Tab. 2 )

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse wie folgt interpretieren:
Mit 1000 µg $Ag^+$ /l ließ sich in Gegenwart von PVA und Methylcellulose bei allen Keimen eine völlige Keimreduktion bereits nach 1 Tag erreichen (Ausnahme s. Cand. alb.), während mit

500 µg $Ag^+$ /l nur bei E. coli Serie A keine Keimfreiheit innerhalb von 10 Tagen erreicht wurde. Dagegen wurde im B-Versuch bei E. coli mit PVA bereits nach 1 Tag die Extinktion 1,0 erreicht. Staph. aur. wurde in allen Lösungen am schnellsten abgetötet. Cand. alb. zeigte gegenüber 500 µg $Ag^+$ /l eine größere Empfindlichkeit als gegenüber 1000 µg.
Ähnliche Schwankungen in der Silberempfindlichkeit gegenüber gleich hohen $Ag^+$ -Konzentrationen zeigten auch Pseud. aer. und E. coli-Stämme in den Versuchen der Tabellen 4 und 5. In Phosphat-Pufferlösung wurde der Extinktionswert 1,0 in Gegenwart von 500 µg $Ag^+$ /l innerhalb von 6 Tagen bei allen Prüfkeimen erreicht außer bei Bac. subt. Dieser Stamm starb auch bei 500 µg $Ag^+$ /l in Wasser (ohne Phosphat) nach 6 Tagen nicht ab, während 1000 µg $Ag^+$ /l in Wasser bereits nach 1 Tag keimtötend wirkten. Sporen von Bac. subt. zeigten keine Ag-Empfindlichkeit, selbst nicht gegenüber 1000 µg $Ag^+$ /l (in der Tabelle nicht aufgeführt).

Versuchsreihe 3

Keimtötende Wirkung von Silberionen (als $AgNO_3$ ) in isotonischer Natriumnitratlösung gegenüber verschiedenen Stämmen von E. coli und Pseud. aer.: Vergleich der Silberempfindlichkeit mit ATCC-Stämmen.

Tabelle 3

| Testkeime | No | Höhe der Keimeinsaat |
|---|---|---|
| E. coli ATCC | 8793 | $1{,}5 \cdot 10^5$ K/ml Prüflösung |
| E. coli | 51171 | $1{,}25 \cdot 10^6$ K/ml Prüflösung |
| E. coli | 0206 | $3{,}8 \cdot 10^6$ K/ml Prüflösung |
| E. coli Dispepsi | | $8 \cdot 10^5$ K/ml Prüflösung |
| E. coli | 0273 | $1{,}5 \cdot 10^6$ K/ml Prüflösung |

Tabelle 4 und 5

| Testkeime | No | Höhe der Keimeinsaat |
|---|---|---|
| Pseud. aer. | 0363 | $1{,}3 \cdot 10^6$ K/ml Prüflösung |
| Pseud. aer. | 1450 | $1{,}6 \cdot 10^6$ K/ml Prüflösung |
| Pseud. aer. | 4569 | $1{,}3 \cdot 10^6$ K/ml Prüflösung |
| Pseud. aer. ATCC 9027 (A) | | $1{,}5 \cdot 10^6$ K/ml Prüflösung |
| Pseud. aer. ATCC 9027 (B) | | $2{,}16 \cdot 10^6$ K/ml Prüflösung |

Keimsuspension in Wasser: 0,1/10,0 ml Prüflösung.
Prüfgefäß: Reagenzgläser aus Pyrex-Glas
Prüfungszeitraum: 14 Tage (nach 4 Wochen Kontrolle der Kolonienzahl)
Lagerung bei Zimmertemperatur und Lichtschutz
$Ag^+$ -Konz./l: 50, 100, 250, 500, 1000 µg
Hilfsstoffe: $NaNO_3$ 0,1 m, Methylcellulose (0,5% Methocel MC 1500) bei E. coli

Bei allen Prüflösungen, die nach 1 Woche noch Keimwachstum im Suspensionsversuch zeigten, wurden die Kolonienzahlen mittels Plattenkulturen bestimmt (Ergebnisse Tab. 3 - 5).

Silberempfindlichkeit von E. coli-Stämmen (Tab. 3)

Aus den Ergebnissen kann man deutlich eine unterschiedliche Widerstandsfähigkeit der verschiedenen E. coli-Stämme gegenüber Silberionen erkennen.
Alle untersuchten Stämme wurden bereits durch 50 µg $Ag^+$ /l in wässriger $NaNO_3$-Lösung ausreichend abgetötet, denn die Zahl der Überlebenden nach 6 Tagen war kleiner als 0,1%. Der ATCC-Stamm zeigte sich etwas empfindlicher als die anderen Stämme, denn durch 100 µg $Ag^+$ /l wurde er bereits nach 1 Tag abgetötet. Die Silberempfindlichkeit der einzelnen Stämme verringerte sich bei Anwesenheit von Methylcellulose. Die Silberkonzentration mußte erhöht werden, um gleiche Abtötungszeiten zu erreichen. Ein E. coli-Stamm (No 0206) wurde von 500 µg $Ag^+$ /l in Gegenwart von 0,5% Methocel MC 1500 ungenügend

abgetötet. Ein weiterer Stamm, No 51171, überlebte in dieser Lösung ebenfalls, jedoch mit $< 0,1\%$ der Ausgangskeimzahl. Der ATCC-Stamm sowie zwei weitere Stämme wurden in der gleichen Lösung nach 6 Tagen vollständig abgetötet. Die Überlebensfähigkeit der Prüfkeime in Abwesenheit von $Ag^+$ - Ionen wurde nachgewiesen. Die Zahl der Keime in den Kontrollflaschen mit 0,1 m $NaNO_3$ -Lösung hatte sich innerhalb 6 Tagen nicht wesentlich verändert.

Silberempfindlichkeit von Pseud. aer.-Stämmen (Tab. 4 u. 5 ).

Von allen Stämmen wurden mehr als $10^6$ K/ml Prüflösung inoculiert, das bedeutet: sehr hohe Keimbelastung der Prüflösungen. Unterschiede in der Sensibilität der Stämme gegenüber Silber zeigen sich deutlich; Stamm No. 1450 war am empfindlichsten.
Die beiden ATCC-Stämme wurden getrennt in Abständen von einer Woche angezüchtet und mit (A) bzw. (B) bezeichnet. Die Höhe der Keimeinsaat war bei (B) mit ca. 2 Mill. K/ml um 1/3 größer als bei (A). Das mag mit ein Grund dafür sein, daß im (B)-Versuch der ATCC-Stamm eine größere Resistenz gegenüber Silber als im (A)-Versuch zeigte.

Versuch A: Bereits 50 µg $Ag^+$ /l töteten die Keime nach einer Woche um $> 99,9\%$ ab (Tab. 5). Bei den höheren $Ag^+$ -Konzentrationen - 250 und 500 µg - überlebten zwar Keime, jedoch war ihre Zahl jeweils $< 0,1\%$.

Versuch B: Eine Keimreduktion von 99,9 % wurde von 250 µg $Ag^+$ /l nicht ganz erreicht, erst bei 500 µg wurden die Keime vollständig abgetötet, allerdings hier bereits nach 1 Tag. Bei (B) nahm die Keimreduktion bei steigender Silberionenkonzentration zu, während beim (A)-Versuch Schwankungen in der Silberempfindlichkeit gefunden wurden. Gegenüber 100 µg $Ag^+$ /l waren die Keime empfindlicher als gegenüber 250 µg.

Ein ähnliches Verhalten wurde auch beim Stamm No 4569 beobachtet. Er wurde von 50 µg $Ag^+$ /l nach 7 Tagen abgetötet und

überlebte in Gegenwart von 100 µg $Ag^+$ /l 14 Tage lang mit $4 \cdot 10^4$ K/ml.

In rein wässrigen schwebstofffreien Lösungen ohne Komplexbildner stieg bei oligodynamischen Versuchen mit Silber die Geschwindigkeit der Keimreduktion in der Regel linear mit der Silberionenkonzentration an. Aus Tab. 1 und 3 sowie aus zahlreichen weiteren Versuchen, die nicht alle im Rahmen dieser Arbeit aufgeführt wurden, kann eine gewisse Linearität angenommen werden.

Streuungen und fehlende Linearität, wie sie bei den Versuchen den Tab. 4 und 5 zu beobachten sind und die sich auch bei den weiteren mikrobiologischen Tests mit Silberverbindungen zeigten, liegen in der großen Beeinflußbarkeit der Silberionenaktivität durch andere Substanzen begründet. (siehe allgemeiner Teil A). Aus diesen Gegebenheiten heraus wurden ja auch schwer lösliche Silberverbindungen als antimikrobiell wirksame Agentien eingesetzt, die wie ein Depot-Präparat eine Proliferation von Silberionen gewährleisten sollen. Insbesondere bei großen Mikroorganismen, die bevorzugt in Agglomeraten vorliegen, wie Cand. alb., und bei stark begeißelten, wie Pseud. aer., wurden entweder größere Abtötungsgeschwindigkeiten bei niedriger $Ag^+$ -Ionenkonzentration als bei höherer beobachtet, oder es ergaben sich keine unterschiedlichen Keimtötungseffete aus variierenden Silberionenkonzentrationen.

Diese Beobachtungen sollten in einem unmittelbaren Zusammenhang mit den Ausführungen unter 3.6 über den Wirkungsmechanismus von Silber gesehen werden, d.h. in Verbindung mit dem Komplexierungsverhalten von Silber gegenüber Proteinen sowie Nukleinsäuren und der geringen Stabilität dieser Komplexe.

Es ist bekannt, daß Streuungen bei den Ergebnissen von mikrobiologischen Tests im allgemeinen sehr hoch sind. Hierüber wurde an anderen Stellen berichtet (91 - 93), desgleichen über die Auswertung mikrobiologischer Prüfungen mit Hilfe statistischer Methoden[1] (11 a).

---

[1] OBERZILL: Mikrobiologische Analytik, Hans Carl, Nürnberg 1967

Verfahrensfehler in der Testdurchführung sind bei den Ergebnissen der Tab. 1 - 5 als mögliche Interpretation der Streuungen nicht anzunehmen. Fälschliche Trübungen der Röhrchen durch Sekundärkontaminanten wurden durch Keimidentifizierung auf Platten erkannt, Dosierungsfehler konnten durch nachträgliche Bestimmungen der $Ag^+$ - Ionenkonzentration im Prüfgefäß erkannt werden.

Zusammenfassung der Versuchsreihen 1 - 3

Aus den Prüfungen nach dem Röhrchensuspensionstest mit verschiedenen konzentrierten Silbernitratlösungen lassen sich folgende richtungsweisende Ergebnisse entnehmen:

1. 50 - 100 µg $Ag^+$ /l waren bei Abwesenheit von Makromolekülen ausreichend mikrobizid wirksam gegenüber 4 ATCC-Stämmen der Keime E. coli, Pseud. aer., Staph. aur. und Cand. alb., desgleichen gegenüber je 4 - 5 anderen geprüften Stämmen von E. coli und Pseud. aeruginosa.
2. Bacillus subtilis und Bacillus cereus waren weniger empfindlich. Erst bei Silberionenkonzentrationen von ~ 500 µg /l konnte in rein wässriger Lösung als auch in Gegenwart makromolekularer Hilfsstoffe eine Extinktion von 1,0 innerhalb von einer Woche erreicht werden.
   Sporen von Bac. subt. wurden auch von 1000 µg $Ag^+$ /l nicht geschädigt.
3. In Gegenwart makromolekularer Hilfsstoffe wie PVA und Methylcellulose mußte die $Ag^+$ - Ionenkonzentration auf mindestens 500 µg $Ag^+$ /l erhöht werden. In Gegenwart von Pepton war Silber unwirksam.
4. E. coli ATCC war empfindlicher gegenüber Silber als andere E. coli-Stämme. Pseud. aer. ATCC schien eher weniger silberempfindlich als andere Pseud.-Stämme zu sein; eine M H K für die Extinktion 1,0 ließ sich bei den drei verschiedenen Testreihen mit dem ATCC-Stamm (Tab. 1 und 4) nicht festsetzen, da hier wie auch bei den anderen Pseud.-Stämmen unterschiedliche Verlaufsformen in der Abtötungscharakteristik zu finden waren, was im Einklang mit den in Kap. 2.2.3 erwähnten Beobachtungen von REYBROUCK und Mitarbeitern (91-93) steht.

Keimtötende Wirkung von $Ag^+$-Ionen im Suspensionsversuch nach DGHM - modifiziert nach Reybrouck

a) Zahl der bewachsenen Röhrchen/Gesamtzahl b) Extinktion (= Verhältnis unbewachsener Röhrchen/Gesamtzahl)

| Prüflösung $Ag^+$ µg/l | Zeit | Staph. aur. ATCC 6538 a. bew. R. | Staph. aur. ATCC 6538 b. Ext. | Pseud. aer. ATCC 9027 a. bew. R. | Pseud. aer. ATCC 9027 b. Ext. | Cand. alb. ATCC 10231 a. bew. R. | Cand. alb. ATCC 10231 b. Ext. | E. coli ATCC 8739 a. bew. R. | E. coli ATCC 8739 b. Ext. | Kontrolle in $H_2O$ ohne Silber | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 / Wasser | 6 Std. | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | + | Staph. aur. |
| | 2 Tg. | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | + | |
| | 3 Tg. | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | + | |
| | 5 Tg. | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | + | |
| 10 / Wasser | 6 Std. | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | + | Pseud. aer. |
| | 2 Tg. | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | + | |
| | 3 Tg. | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | + | |
| | 5 Tg. | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | + | |
| 100 / Wasser | 6 Std. | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | + | Cand. alb. |
| | 2 Tg. | 0/5 | 1,0 | 3/5 | 0,4 | 5/5 | 0 | 0/5 | 1,0 | + | |
| | 3 Tg. | 0/5 | 1,0 | 0/5 | 1,0 | 5/5 | 0 | 0/5 | 1,0 | + | |
| | 5 Tg. | - | - | - | - | - | - | - | - | + | |
| 300 / Wasser | 24 Std. | 5/5 | 0 | 5/5 | 0 | 0/5 | 1,0 | 0/5 | 1,0 | + | E. Coli. |
| | 2 Tg. | 0/5 | 1,0 | 0/5 | 1,0 | - | - | 0/5 | 1,0 | + | |
| | 3 Tg. | - | - | - | - | 0/5 | 1,0 | - | - | + | |
| | 5 Tg. | - | - | - | - | - | - | - | - | + | |
| 1000 / Wasser | 6 Std. | 0/5 | 1,0 | 0/5 | 1,0 | 0/5 | 1,0 | 0/5 | 1,0 | | |
| | 2 Tg. | 0/5 | 1,0 | 0/5 | 1,0 | 0/5 | 1,0 | 0/5 | 1,0 | | |
| 500 in NaCl Phosphat e. Pepton | 2 Tg. | - | - | 5/5 | 0 | - | - | 5/5 | 0 | | |
| | 3 Tg | - | - | 5/5 | 0 | - | - | 4/5 | 0,2 | | |

(+) = Wachstum

Tab.: 1

Keimtötende Wirkung von $Ag^+$-Ionen im Suspensionsversuch nach DGHM – *modifiziert nach Reybrouck*

a) Zahl der bewachsenen Röhrchen/Gesamtzahl  b) Extinktion (= Verhältnis unbewachsener Röhrchen/Gesamtzahl)

in Gegenwart MAKROMOLEKULARER HILFSSTOFFE

| Prüflösung 20 ml $Ag^+$ als $AgNO_3$ | Stufe | E. coli ATCC 8739 A $1{,}2 \cdot 10^6$ K/ml a. bew.R. | b. Ext. | E. coli ATCC 8739 B $1{,}2 \cdot 10^6$ K/ml a. bew.R. | b. Ext. | Staph. aur. ATCC 6538 $55 \cdot 10^3$ K/ml a. bew.R. | b. Ext. | Cand. alb. ATCC 10231 $3 \cdot 10^4$ K/ml a. bew.R. | b. Ext. | Bac.cereus ATCC 9634 $5 \cdot 10^4$ K/ml a. bew.R. | b. Ext. | Bac.subt. ATCC 6633 $10^6$ K/ml a. bew.R. | b. Ext. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1000µg $Ag^+$/l PVA 1 % in Wasser | 1 | 0/3 | 1,0 | 0/3 | 1,0 | 0/3 | 1,0 | 2/3 | 0,3 | 0/3 | 1,0 | 0/3 | 1,0 |
| | 2 | 0/3 | 1,0 | | | 0/3 | 1,0 | | | 2/3 | 0,3 | 0/3 | 1,0 |
| | 6 | | | | | | | | | 1/2 | 0,5 | 0/3 | 1,0 |
| | 7 | | | | | | | 3/3 | 0 | | | | |
| | 10 | | | | | | | 100K/ml. | | 0/3 | 1,0 | 0/3 | 1,0 |
| 500µg $Ag^+$/l PVA 1 % in Wasser | 1 | 4/4 | 0 | 0/3 | 1,0 | 2/3 | 0,3 | 0/3 | 1,0 | 1/3 | 0,67 | 3/3 | 0 |
| | 2 | 4/4 | 0 | | | 0/3 | 1,0 | | | 1/3 | 0,67 | 3/3 | 0 |
| | 6 | 4/4 | 0 | | | 0/3 | 1,0 | | | 1/3 | 0,67 | 3/3 | 0 |
| | 7 | | | | | | | 3/3 | 0 | | | | |
| | 10 | 4/4 | | | | | | 0/3 | 1,0 | 0/3 (13T.) | 1,0 | $10^5$K/ml | |
| 500µg $Ag^+$/l Methocel 1500 0,5% in Wasser | 1 | 4/4 | 0 | 3/3 | 0 | 0/4 | 1,0 | 0/3 | 1,0 | 2/3 | 0,3 | | |
| | 2 | 1/2 | 0,67 | 3/3 | 0 | | | | | 3/3 | 0 | | |
| | 6 | 4/4 | 0 | 3/3 | 0 | | | | | | | | |
| | 7 | | | | | | | | | | | | |
| | 10 | 4/4 | | | | | | 0/3 | 1,0 | 0/3 (13T.) | 1,0 | | |
| 1000µg $Ag^+$/l Methocel 1500 0,5% in $H_2O$ | 1 | 0/3 | 1,0 | 0/3 | 1,0 | 0/4 | 1,0 | 2/3 | 0,67 | 0/3 | 1,0 | | |
| | 2 | | | | | | | | | 0/3 | 1,0 | | |
| | 6 | 0/3 | 1,0 | | | | | | | | | | |
| | 7 | | | | | | | 3/3 | 0 | | | | |
| | 10 | | | | | | | 0/3 (13T) | 1,0 | | | | |
| 500µg $Ag^+$/l isotonische Phosphat-Lsg. ph. 6,6 | 1 | 4/4 | 0 | 0/4 | 1,0 | 4/5 | 0,2 | 0/3 | 1,0 | 1/3 | 0,67 | 3/3 | 0 |
| | 2 | | | | | | | | | 1/3 | 0,67 | 3/3 | 0 |
| | 6 | 0/3 | 1,0 | 0/3 | 1,0 | 0/3 | 1,0 | | | 0/2 | 1,0 | 3/3 | 0 |
| | 7 | | | | | | | 0/3 | 1,0 | | | | |
| | 10 | | | | | | | | | | | | |
| 500µg $Ag^+$/l in $H_2O$ | 1 | | | | | | | | | 3/3 | 0 | 0/3 | 1,0 |
| | 2 | | | | | | | | | 3/3 | 0 | 0/3 | 1,0 |
| | 6 | | | | | | | | | 3/3 | 0 | 0/3 | 1,0 |
| 1000µg $Ag^+$/l in $H_2O$ | 7 | | | | | | | | | 3/3 | 0 | 0/3 | 1,0 |
| | 10 | | | | | | | | | $10^2$K/ml | | | |

6 Bac. subt. 7

Tab.: 2

Suspensionsversuch der DGHM - modifiziert nach Reybrouck

Testkeim: Escheriscnia coli, 5 verschiedene Stämme

Prüflösungen: 10,0 ml + 0,1 ml Keimsuspension

| Stamm: | | ATCC 8793 | | 51171 | | 0206 | | Dispepsi Coli | | 0273 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Keimsuspension | | $E_{\lambda_{623}}$ = 0,235 =$1,5 \cdot 10^7$K/ml | | $E_{\lambda_{623}}$ = 0,265 =$1,25 \cdot 10^8$K/ml | | $E_{\lambda_{623}}$ = 0,268 =$3,8 \cdot 10^8$K/ml | | $E_{\lambda_{623}}$ = 0,250 =$8 \cdot 10^7$K/ml | | $E_{\lambda_{623}}$ = 0,185 =$1,5 \cdot 10^8$K/ml | |
| Prüflösung | | $1,5 \cdot 10^5$ " | | $1,25 \cdot 10^6$ " | | $3,8 \cdot 10^6$" | | $8 \cdot 10^5$ " | | $1,5 \cdot 10^6$ " | |
| $Ag^+$/l | Tage | Wachst. | Ext. | Wachst. | Ext. | Wachst. | Ext. | Wachst. | Ext. | Wachst. | Ext. |
| 50 µg in o,1m $NaNO_3$ | 1 | + + + | o | + + + | o | + + + | o | + + + | o | + + + | o |
| | 4 | - - - | 1 | + + + | o | + + + | o | - - - | 1 | - - - | 1 |
| | 6 | - - - | 1 | + + + =15K/ml | o | - - - | 1 | - - - | 1 | - - - | 1 |
| 100 µg in o,1m $NaNO_3$ | 1 | - - - | 1 | + + + | o | + + + | o | + + + | o | + + + | o |
| | 4 | - - - | 1 | - - - | 1 | + - - | 0,67 | - - - | 1 | - - - | 1 |
| | 6 | - - - | 1 | - - - | 1 | - - - | 1 | - - - | 1 | - - - | 1 |
| 500 µg in o,1m $NaNO_3$+ Methylzellulose 0,5% | 1 | + - - | 0,67 | + + + | o | + + + | o | - - - | 1 | + + - | 0,33 |
| | 4 | + - - | 0,67 | + + =$2,8 \cdot 10^3$ | o | + + + | o | - - | 1 | - - | 1 |
| | 6 | - - - | 1 | + + + =$3 \cdot 10^3$ K/ml | o | + + + =500K/ml | o | - - - | 1 | - - - | 1 |
| Kontrollg. o,1m $NaNO_3$ | 1 | + + + | o | + + | o | + + | o | + + | o | + + | o |
| | 4 | + + | o | + + | o | + + | o | + + + | o | + + | o |
| | 6 | $10^6$K/ml | | $10^6$K/ml | | $10^6$K/ml | | $10^5$K/ml | | $10^5$K/ml | |

Tabelle: 3 - - - kein Wachstum in 3 Röhrchen / Extinktion = 1

+ + + Wachstum in 3 Röhrchen/ Extinktion = 0

Suspensionsversuch DGHM modifiziert nach Reybrock

Testkeim: Pseudomonas aeruginosa – 4 Stämme

| $Ag^+$/l | | 0363 | Ext. | 1450 | Ext. | 4569 | Ext. | ATCC (A) 9027 | Ext. | ATCC (B) 9027 | Ext. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 50 µg in 0,1 m $NaNO_3$ | 1 T. | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 | + + + | 0 |
| | 2 T. | + – | 0,5 | + + | 0,5 | + + | 0 | + + + | 0 | | |
| | 7 T. | + + | 0 | – – | 1 | – – | 1 | + + | 0 | + + + | 0 |
| | 14 T. | + + + | 0 | – – | 1 | – – – | 1 | – – | 1 | + + + | 0 |
| 100 µg in 0,1 m $NaNO_3$ | 1 T. | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 | + + + | 0 | + + + | 0 |
| | 2 T. | + + | 0 | – – – – | 1 | + + | 0 | – – – | 1 | + + + | 0 |
| | 7 T. | + + | 0 | | | + + | 0 | – – | 1 | + + + | 0 |
| | 14 T. | + + + | 0 | – – | 1 | + + + | 0 | – – | 1 | + + + | 0 |
| 250 µg in 0,1 m $NaNO_3$ | 1 T. | + + | 0 | – – – | 1 | + + | 0 | + + + | 0 | + + + | 0 |
| | 2 T. | – – | 1 | – – | 1 | + – | 0,5 | + + + | 0 | + + + | 0 |
| | 7 T. | | | | | | | + + | 0 | + + + | 0 |
| | 14 T. | – – | 1 | – – | 1 | – – | 1 | + – | 0,5 | + + + | 0 |
| 500 µg in 0,1 m $NaNO_3$ | 1 T. | + – | 0,5 | + – | 0,5 | + + | 0 | + + + | 0 | – – – | 1 |
| | 2 T. | – – | 1 | – – | 1 | – – | 1 | + + + | 0 | – – – | 1 |
| | 7 T. | | | | | | | + + | 0 | – – – | 1 |
| | 14 T. | | | | | | | – – | 1 | – – – | 1 |
| 1000 µg in 0,1 m $NaNO_3$ | 1 T. | – – | 1 | – – | 1 | + + | 0 | | | – – – | 1 |
| | 4 T. | – – | 1 | – – | 1 | – – | 1 | | | – – – | 1 |
| | 7 T. | | | | | | | | | – – – | 1 |
| | 14 T. | | | | | | | | | – – – | 1 |
| Kontrollwert 0,1 m $NaNO_3$ | 1 T. | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 |
| | 4 T. | | | | | | | | | | |
| | 7 T. | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 |
| | 14 T. | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 | + + | 0 |

Tabelle: 4 – – – kein Wachstum in 3 Röhrchen/ Extinktion = 1

+ + + Wachstum in 3 Röhrchen/ Extinktion = 0

Keimzahlbestimmung zum Suspensionsversuch [Tab. 4]
Testkeim: Pseudomonas aeruginosa ( 4 Stämme)

nach 7 Tagen und (14 Tagen)

| Stamm | 0363 | 1450 | 4569 | ATCC 9027 (A) | ATCC 9027 (B) |
|---|---|---|---|---|---|
| Ausgangskeimzahl | $1{,}3.10^6$K/ml | $1{,}6.10^6$K/ml | $1{,}3.10^6$K/ml | $1{,}5.10^6$K/ml | $2{,}16.10^6$K/ml |
| Prüflösungen mit Silbernitrat: 50 µg $Ag^+$/l | + + + (+ + +) 14 Tage | kein W. (kein W.) 14 Tage | kein W. | < 100K/ml | $19.10^3$K/ml (+ + +) 4 Wochen |
| 100 µg $Ag^+$/l | (850K/ml)) 14 Tage | o | $4{,}5.10^4$K/ml ($4.10^4$K/ml) 14 Tage | kein W. | $7{,}5.10^3$K/ml (+++) 4 W. |
| 250 µg $Ag^+$/l | o | o | o | 190 K/ml (keinW.) 14 Tage | $2{,}8.10^3$K/ml ( 2000K/ml) 4 Wochen |
| 500 µg $Ag^+$/l | o | o | o | 150 K/ml (keinW.) 14 Tage | kein W. (kein W.) 4 Wochen |
| Vergleichsreihe: Ausgangskeimzahl | $2.10^5$K/ml | $1{,}5.10^5$K/ml | $2{,}5.10^5$K/ml | $3{,}5.10^5$K/ml | |
| 0,1 m $NaNO_3$-Lg. | $5.10^5$K/ml | $5{,}2.10^5$K/ml | $5.10^5$K/ml | $8.10^6$K/ml | |

Tabelle 5 Die Keimzahlen nach 14 Tagen oder 4 Wochen sind in Klammern angegeben.

6.2.1.2 Absterberate in $AgNO_3$ - Lösungen
Prüfungsmethode nach USP XIX (Konservierungsmittelbelastungstest)

In den Tab. 6 - 8 und den Abb. 1 - 6 sind die Ergebnisse der Prüfungen zusammengefaßt, die im wesentlichen als orientierende Untersuchungen zur Abschätzung der Silberempfindlichkeit verschiedener grampositiver und gramnegativer Bakterienstämme sowie Aspergillus oryzae gedacht sind. Dabei sollten Einflüsse auf die antimikrobielle Wirksamkeit von Silberionen getestet werden wie: Sterilisationsbedingungen, pH-Wert, andere Ionen und makromolekulare Hilfsstoffe.
Die Prüfzeit erstreckte sich in den meisten Fällen nur über den Zeitraum bis zum Absterben und nicht über 4 Wochen. In den Elektrolytlösungen, die kein Substrat für die Keime enthalten, ist ein Wiederauskeimen nach erfolgter Keimreduktion auf $< 10$ K/ml auch nicht zu befürchten und auch bei den zahlreichen folgenden Testserien über 4 Wochen in keinem Fall beobachtet worden. Andere Verhältnisse liegen dagegen bei den Hilfsstofflösungen der Abb. 2 vor. Hier wäre für eine abschließende Beurteilung unbedingt der Prüfungszeitraum von 4 Wochen einzuhalten.
Bei Prüfungen von $AgNO_3$ - Lösungen über mehrere Wochen wird der Einfluß der durch Wandadsorption verminderten $Ag^+$ -Ionenkonzentration in der Lösung wirksam, ein Effekt, der die Reproduzierbarkeit der Versuche nachteilig beeinflußt.

Silberempfindlichkeit von E. coli ATCC 8739

1. Tab. 6, Abb. 1
   Geprüft wurden 4 Serien mit 12 Testfläschchen und 3 Vergleichslösungen ohne Silber. Die $Ag^+$ - Ionenkonzentration lag zwischen 20 - 100 µg/l.
   Aus der Tabelle (6) geht hervor, daß pH-Änderungen zwischen 5 und 9 keinen Einfluß auf die Zahl der Keime nach 2 Tagen hatten.
   Die Keime der Serie I waren vor der Keimeinsaat 1 Woche als Suspension eingefroren. Wie Keimzahl in der Vergleichslösung bestätigt ($\sim 10^5$ K/ml nach 2 Tagen), wurden sie in

ihrer Vitalität dadurch nicht geschwächt, wohingegen eine ausreichende Silberempfindlichkeit bei allen Mustern gegeben war ($< 10$ Keime/ml nach 2 Tagen).
Durch Autoklavieren im Endbehälter und Gegenwart von NaCl war die Keimreduktion dennoch unzureichend (Nr. 10 und 11), bei geringer Keimeinsaat der Serie II ($4 \cdot 10^3$ Keime/ml) wurde das Ergebnis nicht negativ beeinflußt. Das Handelsprodukt Mikropur $^R$, das zur Silberung von Trinkwasser benutzt wird, erwies sich bei diesen Versuchsbedingungen als unwirksam.

2. Abb. 2

Den Einfluß makromolekularer Hilfsstoffe auf die Silberempfindlichkeit von E. coli gegenüber derjenigen in rein wässriger $AgNO_3$ - Lösung zeigt Abb. 2.
Als verschärfte Prüfungsbedingung ist die nach 2 Tagen erfolgte Inoculation neuer Keimsuspension nach Absterben der alten Keime in das gleiche Prüfgefäß zu sehen.
Die Serien wurden mit a) = Keimeinsaat $\sim 10^5$ K/ml und b) = Keimeinsaat $> 10^6$ K/ml bezeichnet. Die Prüfnummern der Flaschen sind in Klammern angegeben. Dahinter wird der $Ag^+$ - Gehalt in µg/l aufgeführt.
Die Höhe der Keimeinsaat beeinflußte das Ergebnis der Keimreduktion: bei $> 10^6$ K/ml ließ die antibakterielle Wirksamkeit von $Ag^+$ -Ionen deutlich nach. Auch bei anderen Versuchen zeigten sich ähnliche Ergebnisse.
Nach den vorliegenden Versuchen überlebten bei einer Keimeinsaat von $\sim 10^5$ K/ml und 100 - 200 µg $Ag^+$ /l sowohl in wässriger Lösung als auch in Gegenwart von Methylcellulose und PVA innerhalb von 7 Tagen $< 0,1\%$ der inoculierten Keime.
In Gegenwart einer isotonischen phosphatgepufferten NaCl-Lösung mit Pepton 0,1% zeigte sich auch bei 1000 µg $Ag^+$ /l und nur einmaliger Keimeinsaat von $\sim 10^5$ K/ml keine Reduktion, sondern sogar eine Keimvermehrung.
Diese Ergebnisse stimmen im wesentlichen mit denen der Suspensionstests (Kap. 6.2.1.1) überein.

Versuche Nr. 1, 7, 9

In rein wässrigen $AgNO_3$ - Lösungen wurde E. coli durch 500 µg $Ag^+$ /l (Nr. 1) nach der Keimeinsaat a) und b) innerhalb von 24 Stunden abgetötet. Ungenügende Keimreduktion (nach 7 Tagen 5 - 10%) wurde mit 25 und 50 µg $Ag^+$ /l erreicht.

Versuche Nr. 5, 6, 8: Methocel$^R$ MC 1500 1%

Bei der Keimeinsaat a) von $10^5$ Keime/ml wurde bei Nr. 5 und 6 (100 - 125 µg $Ag^+$ /l ) $\geq$ 99,9% Keimreduktion nach 24 Stunden erreicht, bei Lg Nr. 8 (50 µg $Ag^+$ /l) nicht. Nach erneuter Keimeinsaat b) wurde in allen 3 Lösungen keine Keimreduktion erreicht.

Versuche Nr. 2, 3, 4: Polyvinylalkohol 1% (PVA)

Bei einer Keimeinsaat a) von $\sim 10^5$ Keimen/ml wurden die Keime in allen Lösungen nach 24 Stunden zu $>$ 99,9% reduziert (500, 250 und 200 µg $Ag^+$ /l).

Erneute Keimeinsaat zeigt wiederum ungenügende Keimreduktion.

Silberempfindlichkeit von Pseud. aeruginosa ATCC 3027

1. Tab. 7 und Abb. 3

Die Versuche gleichen den in Tab. 6 (E. coli) beschriebenen. Von Silbernitratlösungen (30 - 500 µg $Ag^+$ /l) mit zum Teil durch $NH_4^+$-Ionen bis auf 9 erhöhten pH-Wert wurden 17 Prüfgefäße in vier Serien geprüft (bei einer Keimeinsaat $10^5$ - $10^6$ K/ml). Die Keime der Serie I wurden wahrscheinlich ungenügend abgetötet, weil bei der Wasserdampfsterilisation im Endbehälter vor der Keimeinsaat die Silberionenkonzentration durch Reduktion und Reaktion mit dem Behältermaterial abnahm. Von den 6 Flaschen mit 30 µg $Ag^+$ /l enthielten 3 Flaschen nach 4 Wochen noch $10^5$ Keime (= 5%), allerdings muß hier die hohe Keimeinsaat berücksichtigt werden von $4.10^6$ Keimen/ml.

Bei SerieIII wurden $2 \cdot 10^4$ Keime/ml bei pH 8 und 20 µg $Ag^+$ /l innerhalb von 2 Tagen abgetötet. Eine bessere Keimreduktion wird also bei geringer Keimeinsaat und erhöhtem pH-Wert erreicht.

An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, daß nur die Ergebnisse von Versuchsreihen einer Serie unmittelbar zu

vergleichen sind, denn abgesehen von den bereits erwähnten Gründen für Streuungen bei mikrobiologischen Versuchsreihen muß der in Kap. 3.5.4 erwähnte große Einfluß der Lagertemperatur auf die Silberwirksamkeit beachtet werden. Bei einer den praktischen Gegebenheiten angepaßten Raumtemperaturlagerung ist mit realen Temperaturen von ca. 10 °C - 30 °C zu rechnen.
In einer Vergleichslösung mit 0,002% Phenylquecksilbernitrat waren bereits nach 10 Stunden keine Keime mehr nachweisbar. Alle Vergleichslösungen ohne Silber zeigten nur geringfügige Keimreduktionen im Prüfungszeitraum.

2. Abb. 4
Prüfung der Silberempfindlichkeit von Pseud. aer. ATCC 9027 gegenüber einem frisch isolierten Stamm aus dem med. Untersuchungsamt Trier.

Bei diesen Versuchen sollte die vielfach zitierte Abnahme der Silberresistenz durch häufiges Anzüchten im Labor überprüft werden (131 -33).
Silbermengen von 13 - 100 µg $Ag^+$ /l waren in Wasser unwirksam gegenüber dem frisch isolierten Stamm von Pseud. aer.
Nach 1 Woche hatten sich die Keime um eine Zehnerpotenz vermehrt.
Der nach 2 Wochen frisch angezüchtete Keim zeigte gegenüber Silbermengen von 100 - 200 µg $Ag^+$ /l in Wasser die gleiche Keimreduktion wie Pseud. aer. ATCC 9027 (kein Wachstum bereits nach 20 Stunden). 100 µg $Ag^+$ /l in gepufferter NaCl-Lösung waren gegenüber beiden Stämmen unwirksam (Endprüfung nach 5 Wochen).
Demnach wurde der Wildstamm empfindlicher gegenüber Silberionen und zeigte eine gewisse Anpassung an das Verhalten anderer Laborstämme.

3. Tab. 8 und Abb. 5
Silberempfindlichkeit von Staph. aur. ATCC 6538

Die Prüfungsbedingungen sind Tab. 8 zu entnehmen. Ein Gehalt

von 75 µg $Ag^+$ /l bedingte eine Keimreduktion von > 99,9% innerhalb von 3 Tagen, ab 250 µg $Ag^+$ /l bereits nach 1 Tag. Phenylquecksilbernitrat 0,002% als Vergleichslösung zeigte vollständige Keimreduktion nach 24 Stunden (oder kürzer).
Im Hinblick auf die hohe Keimeinsaat von $10^6$ – 2 . $10^6$ Keimen/ml wird Staph. aur. als besonders sensibel gegenüber Silberionen angesehen.

Abb. 6
Silberempfindlichkeit von Aspergillus oryzae

Die Keimeinsaat war mit $10^3$ K/ml zu gering. Es erwies sich bei allen Versuchen mit Aspergillus als schwierig, eine ausreichend dichte Keimsuspension herzustellen.
Eine Keimreduktion von > 99,9% nach 6 Tagen wurde bei 1000 µg $Ag^+$ /l in Wasser und 500 µg $Ag^+$ /l in Phosphat-Pufferlösung erreicht. In der gleichen Zeit wurden die Keime durch 500 µg $Ag^+$ /l in Wasser um nur 10% reduziert.
In der Vergleichslösung vermehrten sie sich dagegen während der Prüfungsdauer.

6.2.2 Konservierungsmittelbelastungstests mit "Silberdepots" in Augentropfenflaschen, geprüft an Hilfsstofflösungen für Augentropfen

6.2.2.1 Versilberte Polypropylentropfer (Stella $^{R}$)

Die nachfolgend beschriebenen Belastungstests sind in Tab. 9 sowie in den Abb. 7 - 15 aufgezeichnet. Bei allen Lösungen wurden ATCC-Stämme inoculiert, außerdem Aspergillus oryzae. Der Keimgehalt wurde jeweils über einen Zeitraum von 4 Wochen kontrolliert, ebenfalls dann, wenn in den Tab. 11, 12 und 15 die Absterberate nur über einige Tage dargestellt wurde. Die Prüfergebnisse der Tab. 9 sind in den Abb. 7 - 10 als Absterberate der einzelnen Testkeime wiedergegeben. Die isotonischen Hilfsstofflösungen wurden zum Teil mit sehr hohen, über der USP-Vorschrift liegenden Keimeinsaaten belastet. Bei den Prüfserien der Tab. 11, 13, 14 wurde zweimal in das gleiche Prüfgefäß inoculiert, d.h., nach Absterben der Keime
a) wurden die einer neuen Keimsuspension entstammenden Keime
b) eingeimpft.
Für die einzelnen Hilfsstofflösungen ergaben sich folgende Keimreduktionen

PRÜFLÖSUNGEN

1. isotonische NaCl-Lösung
2. isotonische Phosphat-Pufferlösung c. Pepton 0,1%, pH 7,2

Eine Keimreduktion von > 99,9% innerhalb von 1 - 7 Tagen konnte bei allen Prüfkeimen erreicht werden. Geprüft wurden:
E. coli (3 Vers., Abb. 7 und 15), Staph. aureus (Abb. 8), Bac. cereus (Abb. 9), Cand. alb. (2 Vers., Abb. 10 und 12)
Gleiches Prüfungsergebnis wurde erreicht bei:
Cand. alb. in Phosphatpufferlösung ohne Pepton und E. coli in isotonischer Phosphatlösung pH 6,8 und 8.
Bei Gegenwart von Chlorid blieb die Silberwirkung in allen Fällen in Phosphat-Pepton-Lösungen aus.

3. isotonische $KNO_3$ - und $NaNO_3$-Lösung und dest. Wasser

Alle geprüften Keime wurden innerhalb von 7 Tagen zu 99,9% abgetötet, außer Aspergillus oryzae.
Geprüft wurden: Staph. aur. (3 Vers., Abb. 8 + 13), E. coli (2 Vers. Abb. 14 + 15), Bac. subt. und Bac. cereus (Abb. 13), Cand. alb. (2 Vers., Abb.12). Auch nach der zweiten Keimeinsaat (Abb. 13 + 14) wurden $10^7$ Keime innerhalb von 3 Tagen abgetötet.

4. Methylcellulose (Methocel MC 1500 0,5%) in Wasser, 0,1 m $NaNO_3$-Lösung und in isotonischer Phosphatlösung

Alle geprüften Keime wurden innerhalb einer Woche und kürzer um 99,9% reduziert. In keinem Fall wurde eine erneute Keimvermehrung nach anfänglicher Reduktion auf $<$ 0,1% Überlebende beobachtet.
Geprüft wurden: Staph. aur. (Abb. 8), E. coli (2 Vers., Abb. 15) Cand. alb. (Abb. 12).

5. Borsäurelösung 1,5 und 2%

Alle Keime wurden innerhalb von 1 Tag zu 99,9% reduziert.
Geprüft wurden: Cand. alb. (Abb. 12), Staph. aur., Bac. subt. und Bac. cereus (Abb. 13), E. coli (Abb. 14).

Aspergillus oryzae (Abb. 11)
Wie die Abb. zeigt, wurden bei Versuch (A) ca. 4000 Keime/ml inoculiert, nach 4 Tagen wurden die Keime (B) in die gleiche Flasche inoculiert. Nach 4 Wochen hatten sich die Keime nicht über die für 8 Tage aufgeführte Zahl erhöht. Mit isotonischer $KNO_3$-Lösung wurde ca. 10% Keimreduktion erreicht, in Borsäurelösung 99% nach einer Woche und 99,9% nach 4 Wochen.
Die Anforderungen der USP XIX wären bei diesem Prüfergebnis erfüllt, die strengeren der "Interpharma Arbeitsgruppe Mikrobiologie" nicht.

VERGLEICHSLÖSUNGEN

Die Abbildungen zeigen, daß die Zahl der Keime/ml in den Vergleichslösungen, außer in Borsäurelösung, diejenige der Prüflösungen wesentlich überstieg. Eine Ausnahme machte Bac. cereus, der auch bei anderen Versuchsserien bereits ohne Konservans abstarb und daher als Testkeim nicht besonders geeignet zu sein scheint. In Abb. 13 allerdings vermehrte er sich innerhalb des Prüfungszeitraums in $KNO_3$-Lösung.

Borsäurelösung: Borsäure wirkte in Konzentrationen von 1,5 - 3% bakterizid. Eine Keimreduktion von 99,9% konnte auch bei weiteren hier nicht aufgeführten Versuchen innerhalb einer Woche erreicht werden. Gegenüber Cand. alb., Staph. aur. und Pseud. aer. wirkte Borsäure in der angegebenen Konzentration manchmal nicht ausreichend mikrobizid, so daß ihre Verwendung als alleiniges Konservans in Augentropfen nicht zu empfehlen wäre.

6.2.2.2 Silberchloridfritten

Am Kande wurden bei den oben besprochenen Serien auch die unter 5.1.3 beschriebenen, mit AgCl imprägnierten Glasfritten getestet, die in die Tropfer von Zentrop-Augengläsern eingesetzt wurden. Die Ergebnisse sind in den Abb. 11, 12, 15 wiedergegeben. Ausreichende mikrobizide Wirksamkeit wurde gegenüber E. coli und Cand. alb., nicht ausreichende gegenüber Aspergillus oryzae gefunden.

6.2.2.3 Silberchlorid- und Silberbromidüberzüge auf Siedesteinen - Formlinge aus erstarrten Schmelzen -

Geprüft wurden die ATCC-Stämme von E. coli, Pseud. aer., Staph. aur. und Cand. alb.
Die Formlinge wurden in die Testfläschen gelegt. Alle Keime konnten in Wasser, NaCl- und Borsäurelösung innerhalb von einer Woche zu 99,9% abgetötet werden. In einem Fall war AgBr wirkungslos gegenüber Cand. alb.

## Prüfung der Silberempfindlichkeit

Testkeim: E. coli ATCC 8739 Keimeinsaat: $5.10^5$ K/ml (Serie I,II,IV)

Nährmedium: Mac Conkey-Agar $4.10^3$ K/ml (Serie II)

Testgefäß : Zentrop-Gläser mit $AgNO_3$-Lösung

Ser.I+IV: Lsg. sterilfiltriert, aseptisch in sterilisierte Gefäße abgefüllt. Keimsuspension 1 Wo. eingefroren.

Ser. II+III: Lsg. im Endbehälter autoklaviert. Keimsuspensionen frisch bereitet.

| Prüflösung [µgAg⁺/l] (pH) | 2oml Ges. Nr. | Ser. | überlebende Keime nach: (K/ml) 1oMin. | 1 Tag | 2Tage | 1Wo. | 2Wo. | %überleb.nach |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| [20] $NH_4/H_2O$ (7) | 1 | I | $3,4.10^5$ | $6.10^3$ | 10 | | | < 0,1% 2Tage |
| [20] $H_2O$ (5) | 2 | I | $3 . 10^5$ | < 20 | | | | " " |
| [50] NaCl 0,45% + $NH_4OH$ (9) | 3 | I | $7,5.10^5$ | < 20 | | | | " " |
| [50] NaCl 0,45% (5) | 4 | I | $4,2.10^5$ | < 20 | | | | " " |
| [100] $NH_4^+/H_2O$ (9) | 5 | I | $2,2.10^5$ | < 20 | | | | " " |
| [100] $H_2O$ (5) | 6 | I | $5 .10^5$ | <20 | | | | " " |
| [50] $H_2O$ (5) | 7 | II | $4 . 10^3$ | | <10 | <10 | | " " |
| [100] $H_2O$ (5) | 8 | II | $2 . 10^3$ | | <10 | <10 | | " " |
| [100] $H_2O$ (5) | 9 | II | $4 . 10^3$ | | <10 | <10 | | " " |
| [20] NaCl 0,9% | 10 | III | $2.10^5$ | | | $1,2.10^4$ | $10^4$ | >10% 2Wo. |
| Micropur 100mg | 11 | III | $2.10^5$ | | | $5.10^5$ | $6,4.10^5$ | >100% 2Wo. |
| [50] $H_2O$ | 12 | IV | $9,2.10^5$ | $10^3$ | < 10 | | | < 0,1% 2Ta |

Vergleichslösungen ohne Silber

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $H_2O$ | $V_1$ | I | $8.10^5$ | $1,2.10^5$ | |
| $H_2O$ | $V_2$ | II | $4.10^4$ | $5.10^5$ | $1,8.10^6$ |
| $H_2O$ | $V_4$ | IV | $10^6$ | $1,5.10^5$ | |

Tab.: 6

## Prüfung der Silberempfindlichkeit

Testkeim : Pseud. aerug. ATCC 9027 Keimeinsaat: $10^5$-$10^6$ Keime/ml

Nährmedium: CASO-Agar

Testgefäß :Zentrop-Gläser mit $AgNO_3$-Lsg. Testserien:I,II,III,IV

Serie I: Lösung im Testgefäß autoklaviert

Serien II-IV: Lösung sterilfiltriert, aseptisch in sterilisierte Gefäße abgefüllt.(Keimsuspension 1Wo.eingefroren)

| Prüflösung µgAg/l | | 2o,o pH | Gef. Nr. | Ser. | überlebende Keime nach(K/ml) 10Min. | 2Tage | 1 Wo. | 3-4 Wo. | %Überlebende Keime nach |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 100 | $H_2O$ | 5 | 1 | I | $4.10^5$ | $1{,}2.10^3$ | $12.10^5$ | | 30% 1Woche |
| 100 | $H_2O$ | 5 | 2 | I | $5.10^5$ | $1{,}5.10^2$ | $5.10^4$ | | 10% 1 Woche |
| 50 | $H_2O$ | 5 | 3 | I | $3.10^3$ | $1{,}9.10^3$ | $10^5$ | | 30% 1Woche |
| 250 | $H_2O$ | 5 | 4 | II | $6{,}4.10^4$ | <20 | | <20 | <0,1% 2 Tage |
| 130 | $H_2O$ | 5 | 5 | II | $2{,}1.10^5$ | <20 | | <10 | <0,1% 2 Tage |
| 300 | $H_2O/NH_4^+$ | 9 | 6 | III | $9.10^4$ | <20 | | <10 | " " |
| 500 | $H_2O$, | 5 | 7 | III | $1{,}5.10^4$ | <20 | | <10 | " " |
| 100 | $H_2O$ | 5 | 8 | III | $4.10^4$ | <20 | | <10 | " " |
| 100 | $H_2O/NH_4^+$ | 9 | 9 | III | $1{,}3.10^5$ | <20 | | <10 | " " |
| 200 | $H_2O/NH_4^+$ | 8 | 10 | III | $1{,}7.10^5$ | <20 | | <10 | " " |
| 20 | $H_2O/NH_4^+$ | 8 | 11 | III | $2.10^4$ | <20 | | <10 | " " |
| 30 | $H_2O$(3X) | | 12-14 | IV | $4.10^6$ | $< 10^3$ | 10 | 10 | " " |
| 30 | $H_2O$ (3X) | | 15-17 | IV | $4.10^6$ | $\sim 10^3$ | $\sim 10^5$ | $\sim 10^5$ | 5% 4Wochen |
| | | | | | Vergleichslösungen ohne Silber | | | | |
| $H_2O$ | | 5 | $V_a$ | I | $4.10^6$ | $1{,}3.10^6$ | $1{,}4.10^6$ | $1{,}5.10^6$ | ~40% 4Wochen |
| $H_2O$ | | 5 | $V_b$ | III | $2.10^5$ | $1{,}4.10^5$ | $10^5$ | | 50% 1 Woche |
| Phenyl-Hg-nitrat 0.002 % | | | $V_c$ | | <10(10h) | | | | |

Tab.: 7

Silberempfindlichkeit

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

*Testkeim:* Staph. aureus ATCC 6538 *Keimeinsaat:* $10^6$-$2.10^6$ *K/ml* Serie: 5.76 / 2.76I / 2.76II

*überlebende Keime nach*

| Nr. a120c | Prüflösung Zentrop.Flasche | G | N | 1 Tag K/ml | 3 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3+4 Wo. K/ml | % Überleb. Keime | Serie Nr. | PH Wert |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | dest. Wasser + | D | I | | $\sim 10^3$ | < 10 | < 10 | | < 0,1% 1Wo | 5.76 | 5,0 |
| 2 | 30 µg $Ag^+$/l | D | I | | < $10^3$ | < 10 | < 10 | | " " | " | 5,0 |
| 3 | als $AgNO_3$ | D | I | | $10^5$ | < 10 | < 10 | | " " | " | 5,0 |
| 4 | " | D | I | | < $100_3$ | < 10 | < 10 | | " " | " | 5,0 |
| 5 | " | D | I | | $10^3$ | < 10 | < 10 | | " " | " | 5,0 |
| 6 | 75 µg $Ag^+$/l | D | I | | < $100_5$ | 30 | 250 | | " " | " | 5,0 |
| 7 | 50 µg $Ag^+$/l | D | I | $4.10^5$ | $\sim 10^5$ | < 10 | | | " " | " | 5,0 |
| 8 | 250 µg $Ag^+$/l | D | I | 10 | < 10 | < 10 | | | " 1T. | 2.76I | 5,0 |
| 9 | 300 µg $Ag^+$/l + $NH_4$-Ionen | D | I | < 100 | < 10 | < 10 | | | " " | " 2.76II | 5,0 9,0 |
| 10 | 1000 µg $Ag^+$/l | D | I | < 100 | < 10 | < 10 | | | " " | " | 5,0 |
| | Vergleichslösung in dest. Wasser | Vergleichslösungen | | | | | | | | | |
| $V_A$ | Serie 5.76 = A | | I | | $1,5.10^3$ | 550 | | | | | |
| $V_B$ | " 2.76I = B | | I | | $\sim 10^5$ | | | | | | |
| $V_C$ | " 2.76II = C | | I | $6.10^4$ | $2.10^4$ | $1,4.10^3$ | | | | | |
| P | Phenyl-Hg-nitrat 0,002% in dest. $H_2O$ | | I | < 10 | | | | | | | |

Tab.: 8

Prüfungsbedingungen:

Die Silberempfindlichkeit des Testkeims wurde in wäßrigen $AgNO_3$-Lösungen mit unterschiedlichen $Ag^+$ - Ionenkonzentrationen geprüft. (3 Serien) Alle Lösungen wurden durch Sterilfiltration über Membranfilter entkeimt und aseptisch in vorsterilisierte Zentrop-Augentropfflaschen abgefüllt. Keimsuspension in NaCl-Phosphat-Pufferlösung: davon 0,1/20,o inocculiert. Lagerung der Prüflösungen: Zimmertemperatur

Nährmedien: (N) + 0,25% Na.-Thioglycolat

I CASO-Agar
II Mac CONKEY-Agar
III Sab.- Maltose-Agar
IV CSB-Bouillon
V Sab.-Maltose-Bouillon

Gefäße: (G)

A Silberchlorid-Ring Zentrop-Flasche
B Silbercholrid-Fritte
C versilberte Pipette Stella-Flasche
D $AgNO_3$ - Lösung

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

**Gefäße:** Pipetten versilbert "Stella" **Keimeinsaat:** $3 \cdot 10^6$ - $7 \cdot 10^6$ K/ml

ÄO-sterilisiert überlebende Keime nach

Serie: 11.76

| | Prüflösung | Testkeim Nr. | M | 5-10 Min K/ml | 2 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3+4 Wo. K/ml | % Überleb. Keime nach | Vers. Nr. | pH nach 4 Wo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vergleichs-Lösung ohne Silber | Natriumchlorid Lösung 0,9% | 1 | I | $7,6 \cdot 10^6$ | $6,6 \cdot 10^6$ | $9,4 \cdot 10^6$ | $16 \cdot 10^6$ | $10^4$-$10^5$ | 1-5% 4Wo. | 1 | 6,0 |
| | | 1 | I | $5 \cdot 10^6$ | $12 \cdot 10^6$ | $20 \cdot 10^6$ | $13 \cdot 10^6$ | $4,6 \cdot 10^5$ | ~10% 4Wo. | 5 | 6,0 |
| | | 3 | I | $7,4 \cdot 10^6$ | $2,7 \cdot 10^6$ | $2,8 \cdot 10^5$ | n.z | n.z. | n.z. | 17 | 5,6 |
| | | 5 | I | $2,6 \cdot 10^6$ | 220 | 200 | 285 | 45 | < 0,1% 2T. | 13 | 6,5 |
| | | 6 | V | $2,7 \cdot 10^6$ | $9,8 \cdot 10^5$ | $2 \cdot 10^4$ | $7,9 \cdot 10^3$ | $7 \cdot 10^3$ | 0,3% 4Wo. | 9 | 6,0 |
| | Borsäure-Lösung 2% | 1 | I | $6 \cdot 10^5$ | 10 | <10 | <10 | <10 | < 0,1% 2T. | 2 | 5,0 |
| | | 1 | I | $4 \cdot 10^6$ | $6,8 \cdot 10^4$ | 500 | <10 | <10 | < 0,1% 1W. | 6 | 5,0 |
| | | 3 | I | $5,6 \cdot 10^5$ | $2,3 \cdot 10^5$ | $2,7 \cdot 10^3$ | <10 | <10 | 0,5% 1W. | 18 | 5,0 |
| | | 5 | I | $3 \cdot 10^5$ | 460 | 770 | 740 | 350 | < 0,1% 2T. | 14 | 5,0 |
| | | 6 | V | $3,8 \cdot 10^6$ | $2,4 \cdot 10^6$ | $5,5 \cdot 10^4$ | $1,3 \cdot 10^4$ | 10 | 2 % 1W. | 10 | 5,0 |
| Pipetten versilbert | Natriumchlorid Lösung 0,9% | 1 | I | $5,5 \cdot 10^6$ | 368 | <10 | <10 | <10 | < 0,1% 2T. | 3 | 6,0 |
| | | 1 | I | $6 \cdot 10^6$ | <10 | <10 | <10 | <10 | " " | 7 | 6,3 |
| | | 3 | I | $3,9 \cdot 10^6$ | $5 \cdot 10^5$ | $3,4 \cdot 10^3$ | <10 | <10 | " 1Wo. | 19 | 5,8 |
| | | 5 | I | $1,3 \cdot 10^6$ | 900 | 120 | 140 | 165 | " 2T. | 15 | 6,5 |
| | | 6 | V | $7,2 \cdot 10^6$ | $5 \cdot 10^4$ | 100 | 50 | <10 | " 1Wo. | 11 | 6,0 |
| | Phosphat-Pufferlösung c. Pepton 0,1% | 1 | I | $4,3 \cdot 10^6$ | <10 | <10 | <10 | <10 | < 0,1% 2T | 4 | 7,2 |
| | | 1 | I | $1,4 \cdot 10^6$ | " | " | " | " | " " | 8 | 7,2 |
| | | 3 | I | $12 \cdot 10^6$ | $10^5$ | 50 | " | " | " 1Wo. | 21 | 7,2 |
| | | 5 | I | $3 \cdot 10^5$ | 350 | <10 | " | " | " 1Wo. | 16 | 7,2 |
| | | 6 | V | $2 \cdot 10^6$ | $4,4 \cdot 10^3$ | $1,7 \cdot 10^3$ | 270 | " | " 1Wo. | 12 | 7,2 |
| | dest. Wasser | 6 | V | $6,5 \cdot 10^5$ | 750 | <10 | <10 | " | < 0,1% 2T. | 12a | 5,8 |
| | 0,1 m $NaNO_3$-Lg. | 3 | I | $3,4 \cdot 10^6$ | 575 | " | " | " | < 0,1% 2T. | 2o | 5,8 |
| | 0,1 m $NaNO_3$-Lg- c. Tylose MH | 3 | I | $9,4 \cdot 10^6$ | $2,5 \cdot 10^5$ | 600 | " | " | < 0,1% 1W. | 22 | 5,8 |

Tab. 9

Nährmedien: (M) + 0,25% Na.-Thioglycolat

I CASO-Agar
II Mac CONKEY-Agar
III Sab.- Maltose-Agar
IV CSB-Bouillon
V Sab.-Maltose-Bouillon

Testkeim: 1. E. coli ATCC 8739
2. Pseud. aer. ATCC 9027
3. Staph. aur. ATCC 6538
4. Bac.subt. ATCC 6633
5. Bac.cereus ATCC 9634
6. Cand. alb. ATCC 10231

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

Methylzellulose für Augentropfen — Viskosität der Lösungen: < 10 cP
Lösungen in Wasser: mit u. ohne NaCl — 4 Testkeime: Serie: 11.77
Handelspräpa rate: Methocel E 4 M premium
Herst: Dow Comp. Methocel MC 1500

1) E. coli ATCC 8739
2) Pseud.aer.ATCC 9027
e) Enterobacter Wildstamm
6) Cand alb. ATCC 10231

MC-Lösungen schwebstoffrei filtriert (G2-Fritte)
autoklaviert aseptisch in sterilisierte Gefäße gefüllt
Lagerung: Raum temp.-liegend während der Prüfdauer
Keimeinsaat: 2. T. nach Herstellung

Keimeinsaat: $10^6$ K/ml 1,2,e $6.10^4$ = 6

| Nr. | Prüflösung | G | M | 1 Tag K/ml | 3Tage K/ml | 1Woche K/ml | 2Woch K/ml | 3+4Wo. K/ml | %Überleb. Keime nach | Keimart | pH nach 4Wo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-4 | Methocel E 4 M premium 0,1 % in wasser | C | I+III | | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% 3T | 1,2,e,6 | |
| 5-10 | | A | bei | | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% 3T | 1,1,2,e,e | |
| 11 | | A | 1,2,e | | 50 | 70 | < 10 | 150 | < 0,1% 3 T. | 2 | 5,5 |
| 12 | | A | I+V bei 6) | | $32.10^4$ | $25.10^4$ | $8.10^4$ | $26.10^4$ | 130% 2Wo. | 6 | |
| 13-15 | Methocel MC 1500 | A | | | 170 | < 10 | 10 | 10 | < 0,1% 3T | 1,1,e | |
| 16 | o,5% in Wasser | " | " | | $6.10^3$ | $10^4$ | $10^4$ | $5.10^3$ | 1% 2Wo. | e | |
| 17 | | " | | | $2.10^6$ | ~ $10^7$ | $10^6$ | $10^6$ | 100% 2Wo. | 2 | 5,5 |
| 18 | | " | | | $45.10^4$ | $6.10^4$ | $7.10^4$ | $15.10^4$ | 220% 2Wo. | 6 | |
| 19 | | " | | | 850 | $2.10^3$ | $26.10^4$ | $10^4$ | 80% 2Wo. | 6 | |
| 20 | Methocel MC 1500 0,25% in NACL | A | | | $4.10^4$ | $2.10^5$ | $5.10^5$ | $5.10^5$ | 50% 4 Wo. | e | |
| 21 | | " | | | $10^5$ | $10^5$ | $6.10^5$ | $5.10^5$ | 50% 4Wo. | e | |
| 22 | | " | | | $10^6$ | $10^7$ | $10^6$ | $10^6$ | 100% 4Wo. | 2 | 5, |
| 23 | | " | | | 800 | < 10 | 10 | 10 | < 0,1% 3T. | 1 | |
| 24-26 | Methocel E 4 M premium 0,05% in NaCl - Lösung | C | | | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | < o.1%3T. | 1,2,e | 5,5 |
| Vergleichs Lösungen ohne Silber | Methocel MC 1500 0,25% in NaCl-Lös | W1a | I | $8.10^5$ | $8.10^5$ | $3.10^6$ | $2,8.10^6$ | ~$10^6$ | 100% 4Wo. | 1 | |
| | | V1b | | $8.10^5$ | $8.10^5$ | $4.10^6$ | $2,8.10^6$ | ~$10^6$ | | 1 | 5,5 |
| | " | V2a | I | $9.10^5$ | | $7,5.10^6$ | $9.10^5$ | $5.10^6$ | 500% 4Wo. | 2 | |
| | | Ve | | $7.10^5$ | | $8.10^5$ | $6,5.10^5$ | $7.10^5$ | 70% 4Wo. | e | 5,5 |
| | Methocel MC 1500 0,5% in Wasser | W. 6 | III | $6.10^4$ | | $10^5$ | $9.10^4$ | 100 | 1% 4Wo. 100% 2Wo. | 6 | 5,5 |
| | NaCl-Lösung 0,9% | V2b | I | | | $2.10^6$ | $9.10^6$ | $2.10^6$ | 200% 4Wo. | 2 | 5,5 |

Ton 10 Nährmedien: (N) + 0,25% Na.-Thioglycolat

I CASO-Agar
II Mac CONKEY-Agar
III Sab.- Maltose-Agar
IV CSB-Bouillon
V Sab.-Maltose-Bouillon

Gefäße: (G)

A Silberchlorid-Ring Zentrop-Flasche
B Silberchlorid-Fritte
C versilberte Pipette Stella-Flasche

SILBEREMPFINDLICHKEIT

MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

Testkeim: E.coli ATCC 8739 Keimeinsaat: ~ $4 \cdot 10^3$ K/ml Serie II
~ $5 \cdot 10^5$ " " " I III IV

Prüflösung: $AgNO_3$-Lösungen (Tab. 6)

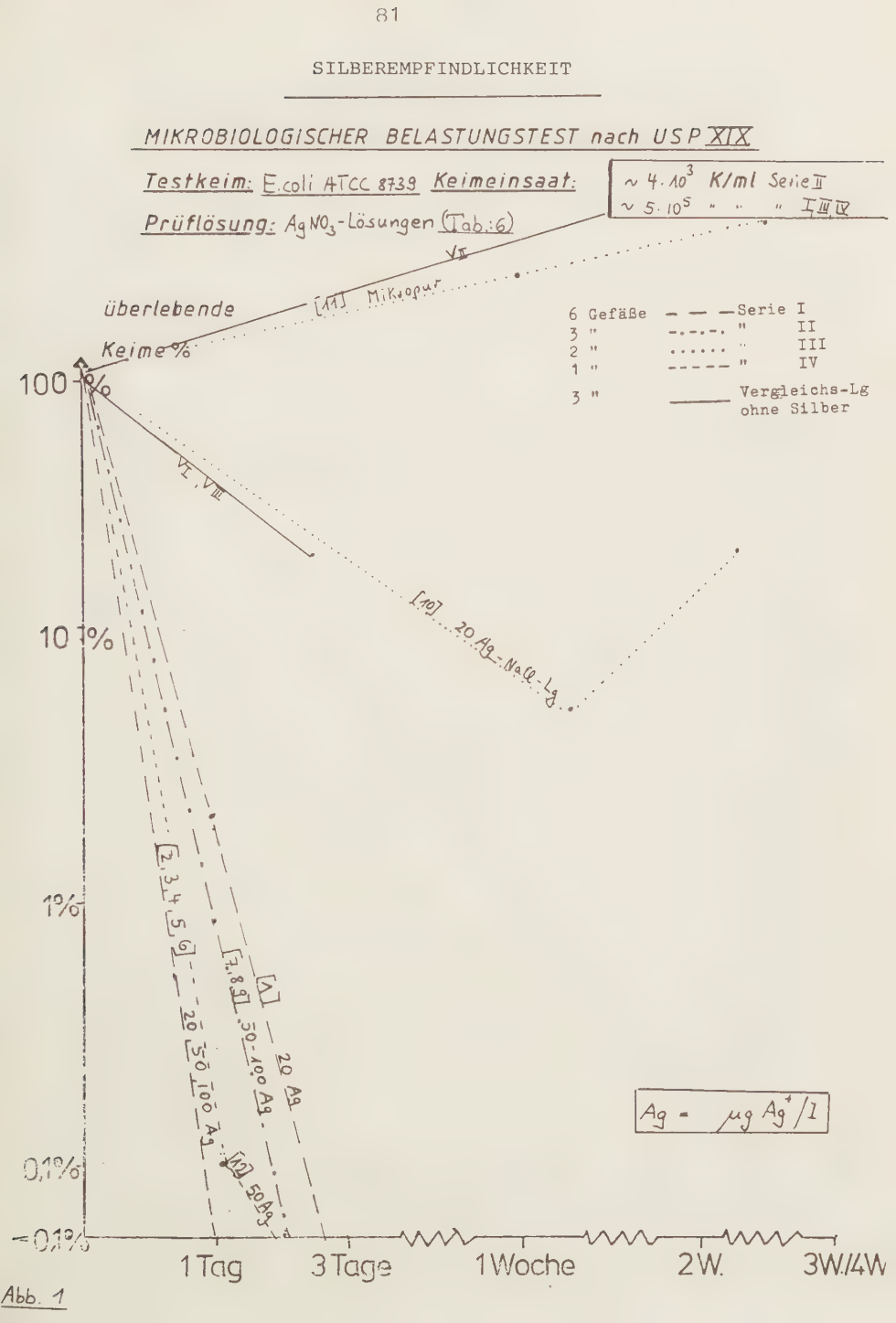



Abb. 1

Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit von $Ag^+$

in Gegenwart von Methylcellulose und PVA

Testkeim: E. Coli ATCC 8739

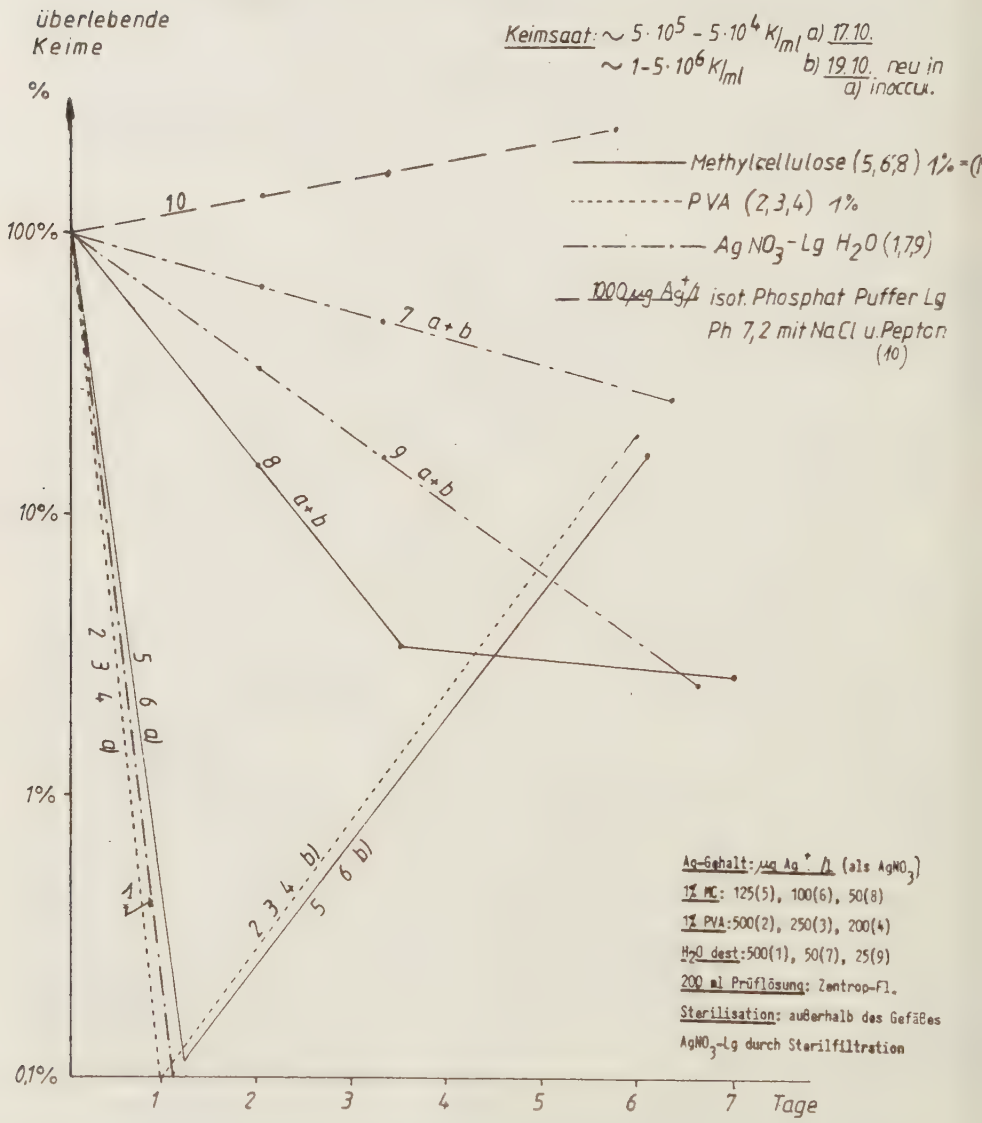



Abb. 2

SILBEREMPFINDLICHKEIT

MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

Testkeim: Pseud. aer. ATCC 9027 Keimeinsaat: ~ $10^5$-$10^6$ K/ml

Prüflösung: $AgNO_3$ - Lösungen (Tab: 7)

3 Gefäße ------ Serie I
8 " _____ " II u. III
6 " ..... " IV
2 " -.-.-.- Vergleichs-Lg $H_2O$
1 Gefäß ..... " + 0,002% PQ

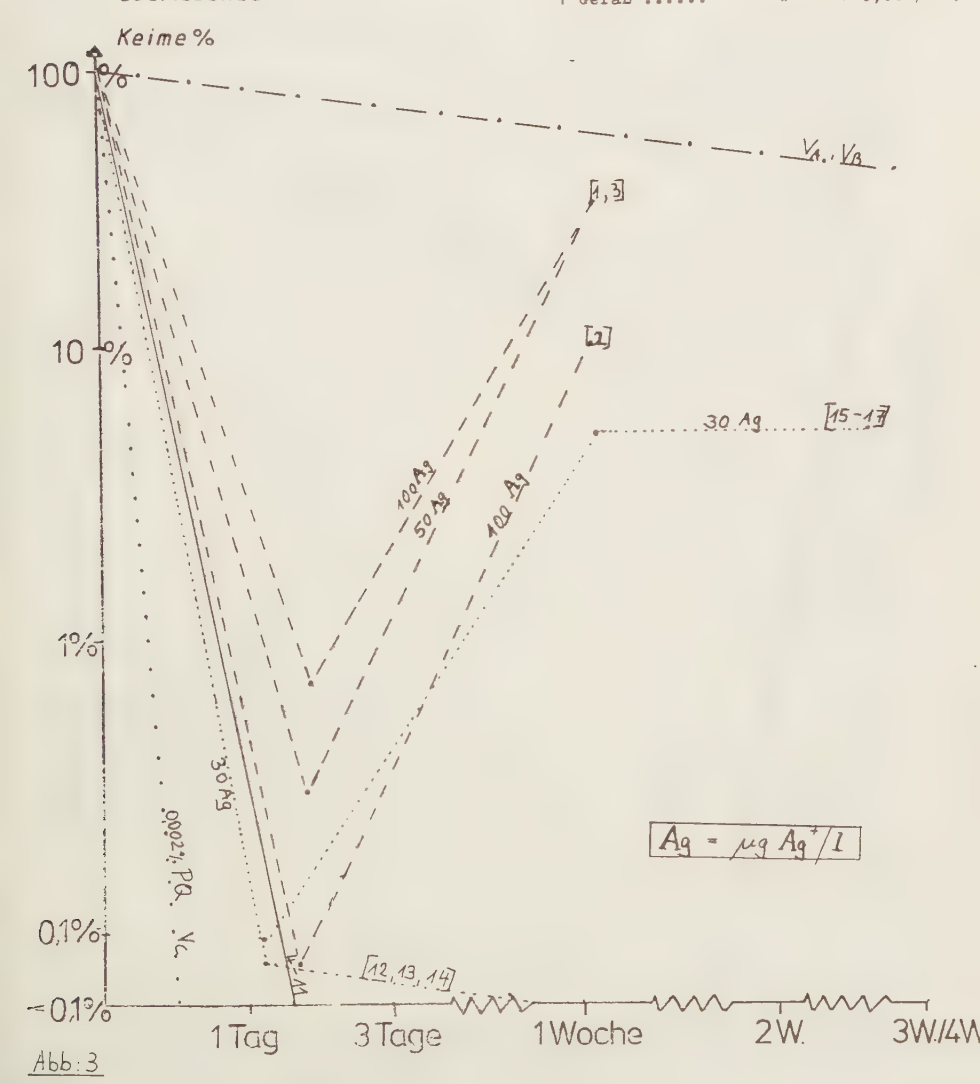



Abb: 3

Silberempfindlichkeit - Laborstamm und Wildstamm

MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

Testkeim: Pseud. aeruginosa Keimeinsaat: $\sim 10^6$ K/ml

Prüflösung: $AgNO_3$- Lösungen

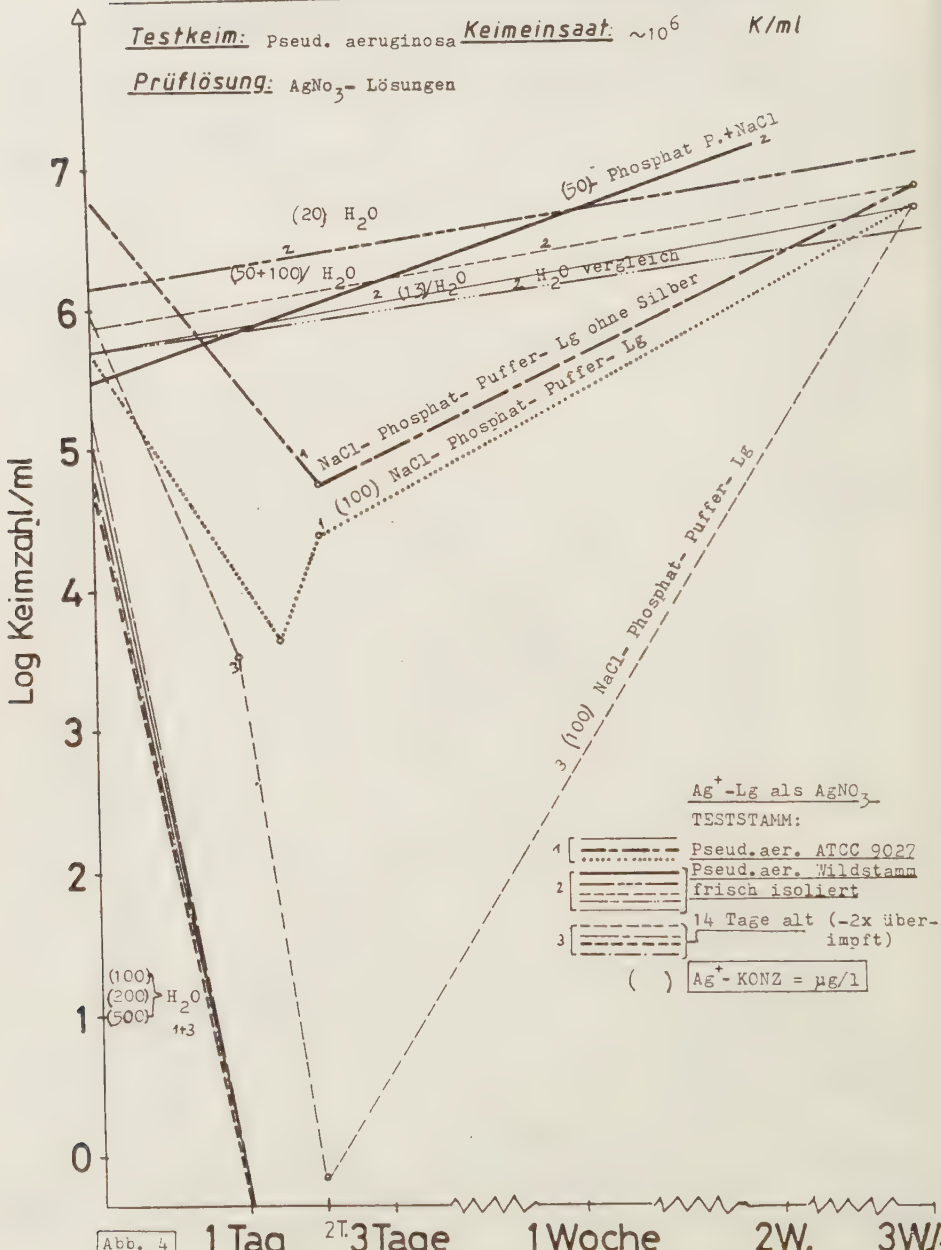



Abb. 4

SILBEREMPFINDLICHKEIT

MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

Testkeim: Staph auv. ATCC 6538 Keimeinsaat: $10^6$-$2 \cdot 10^6$ K/ml Serie: 5.76, 2.76 I, 2.76 II

Prüflösung: $AgNO_3$-Lösungen (Tab.: 8)

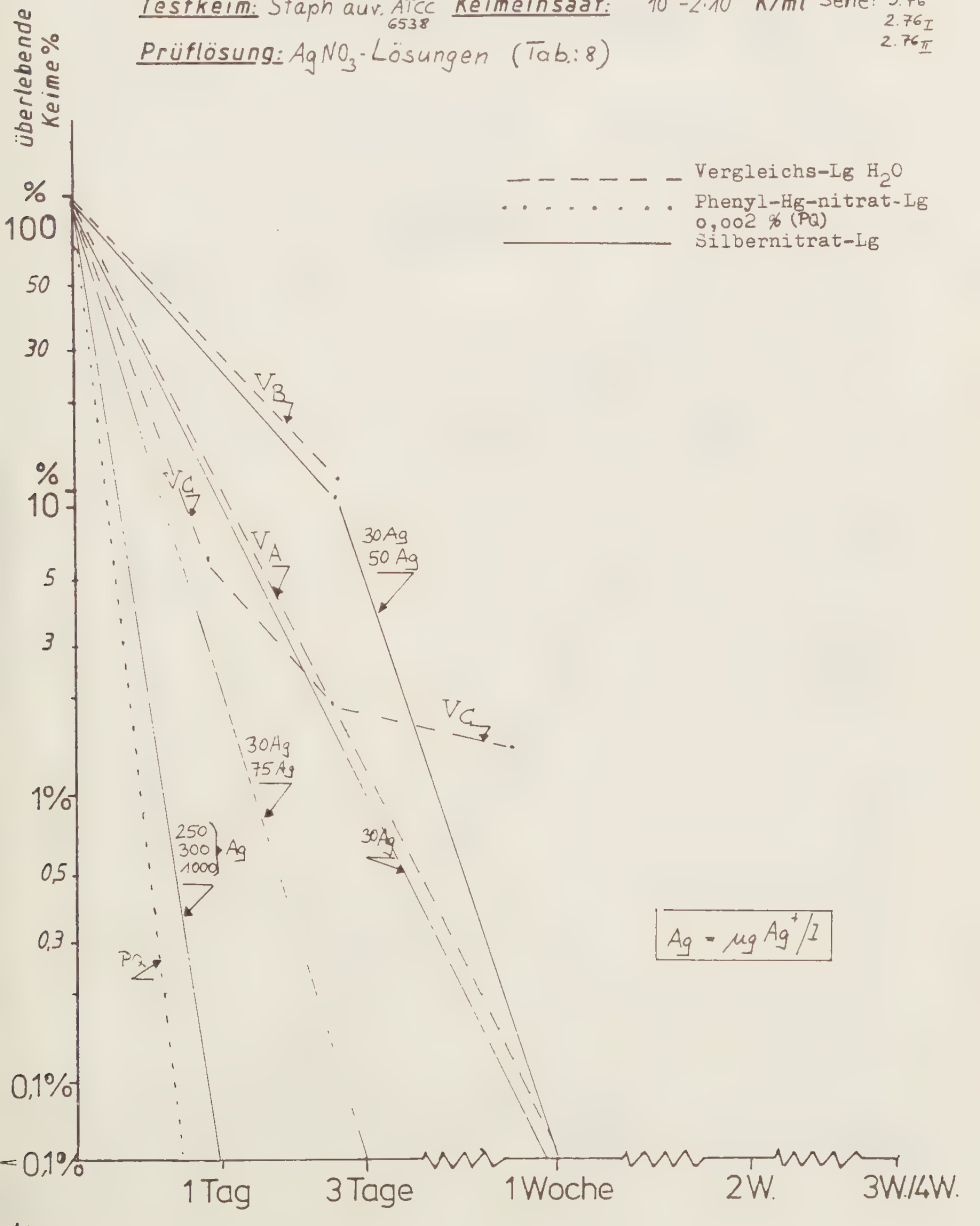



Abb 5

Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit verschiedener $Ag^+$- Konzentrationen gegen Aspergillus oryzae

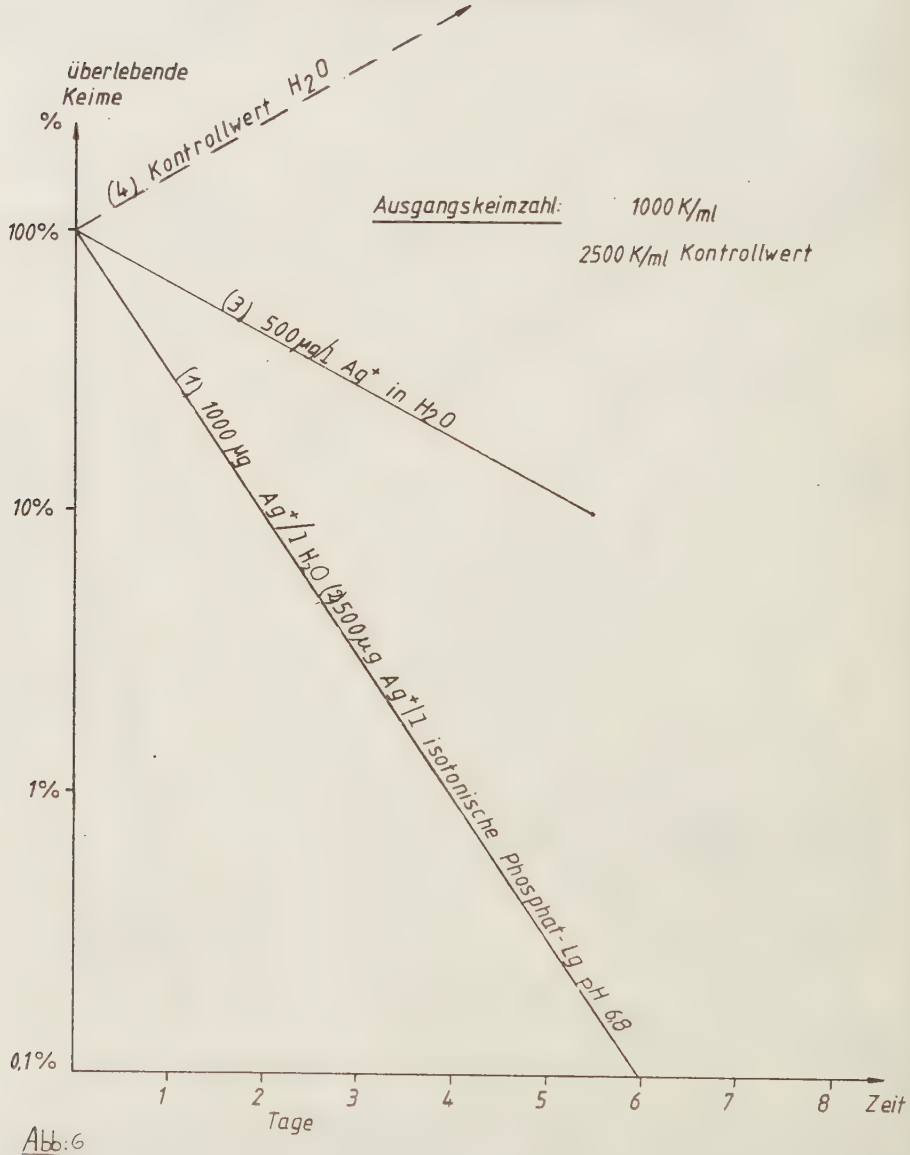
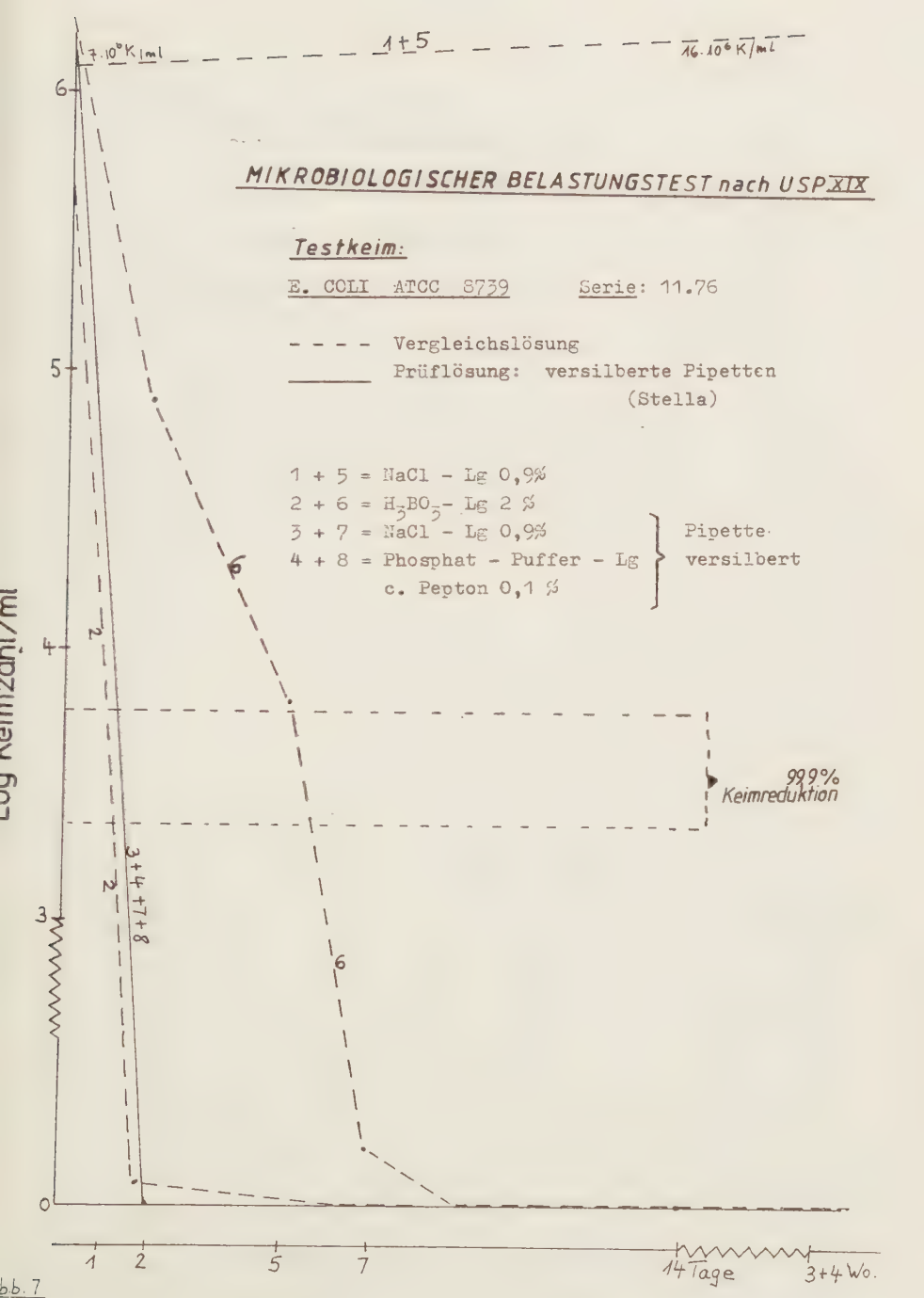



Abb: 6


1+5
7.10⁵ K/ml
16.10⁶ K/ml
MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX
Testkeim:
E. COLI ATCC 8739
Serie: 11.76
- - - - Vergleichslösung
_____ Prüflösung: versilberte Pipetten (Stella)
1 + 5 = NaCl - Lg 0,9%
2 + 6 = H3BO3 - Lg 2 %
3 + 7 = NaCl - Lg 0,9%
4 + 8 = Phosphat - Puffer - Lg c. Pepton 0,1 %
Pipette versilbert
99,9% Keimreduktion
Log Keimzahl/ml
6
5
4
3
0
1
2
5
7
14 Tage
3+4 Wo.
3+4+7+8

bb. 7

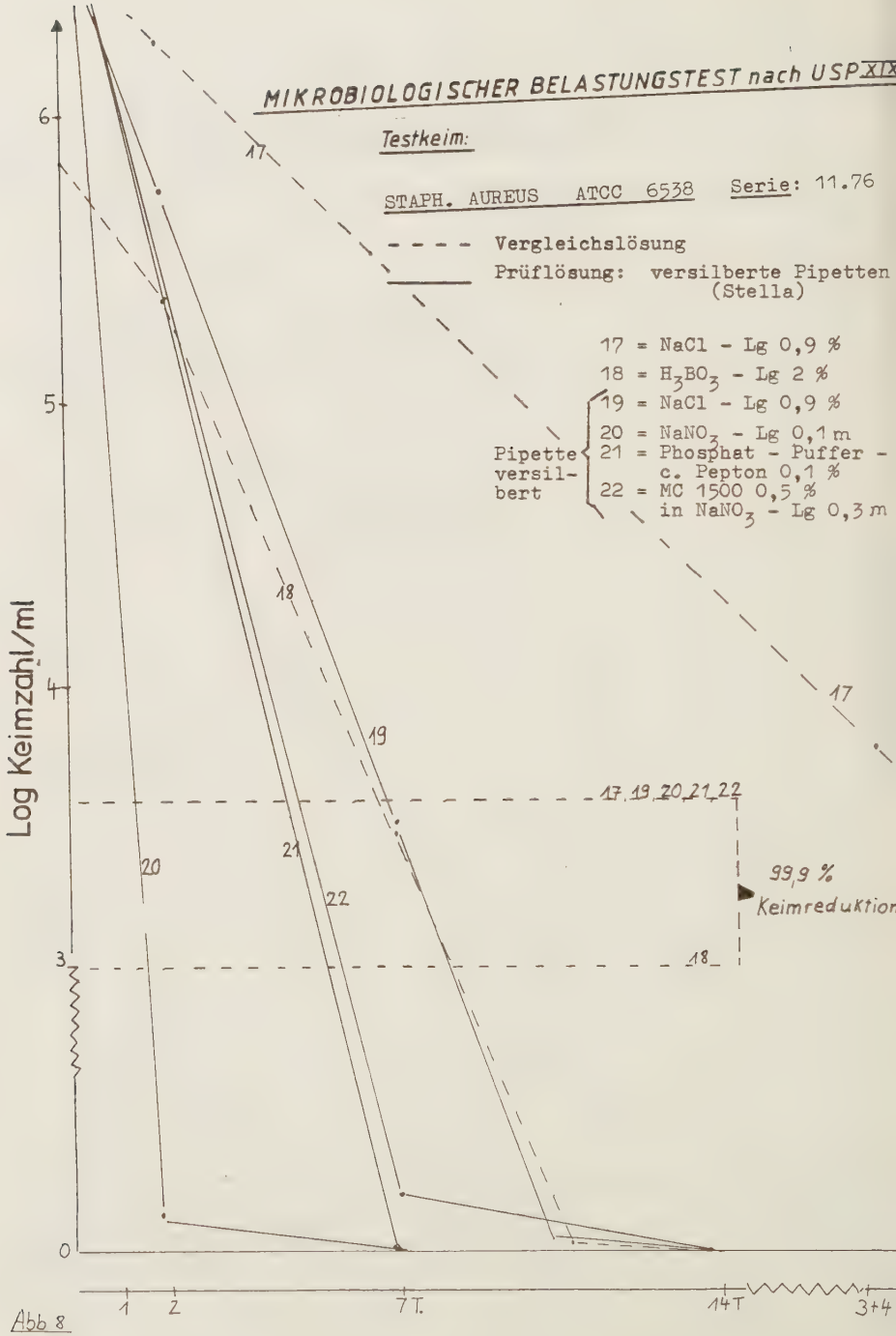

MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX
Testkeim:
STAPH. AUREUS ATCC 6538
Serie: 11.76
Vergleichslösung
Prüflösung: versilberte Pipetten (Stella)
17 = NaCl - Lg 0,9 %
18 = H3BO3 - Lg 2 %
19 = NaCl - Lg 0,9 %
20 = NaNO3 - Lg 0,1 m
21 = Phosphat - Puffer - c. Pepton 0,1 %
22 = MC 1500 0,5 % in NaNO3 - Lg 0,3 m
Pipette versilbert
Log Keimzahl/ml
6
5
4
3
0
17
18
19
20
21
22
17,18,20,21,22
99,9 % Keimreduktion
1
2
7 T.
14 T
3+4

Abb 8

## MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

**Testkeim:**

BAC. CEREUS ATCC 9634 Serie: 11.76

- - - - Vergleichslösung

——— Prüflösung: versilberte Pipetten (Stella)

13 = NaCl - Lg 0,9 %

14 = $H_3BO_3$ - Lg 2 %

15 = NaCl - Lg 0,9 %
16 = Phosphat - Puffer - Lg c. Pepton 0,1 %
} Pipette versilbert

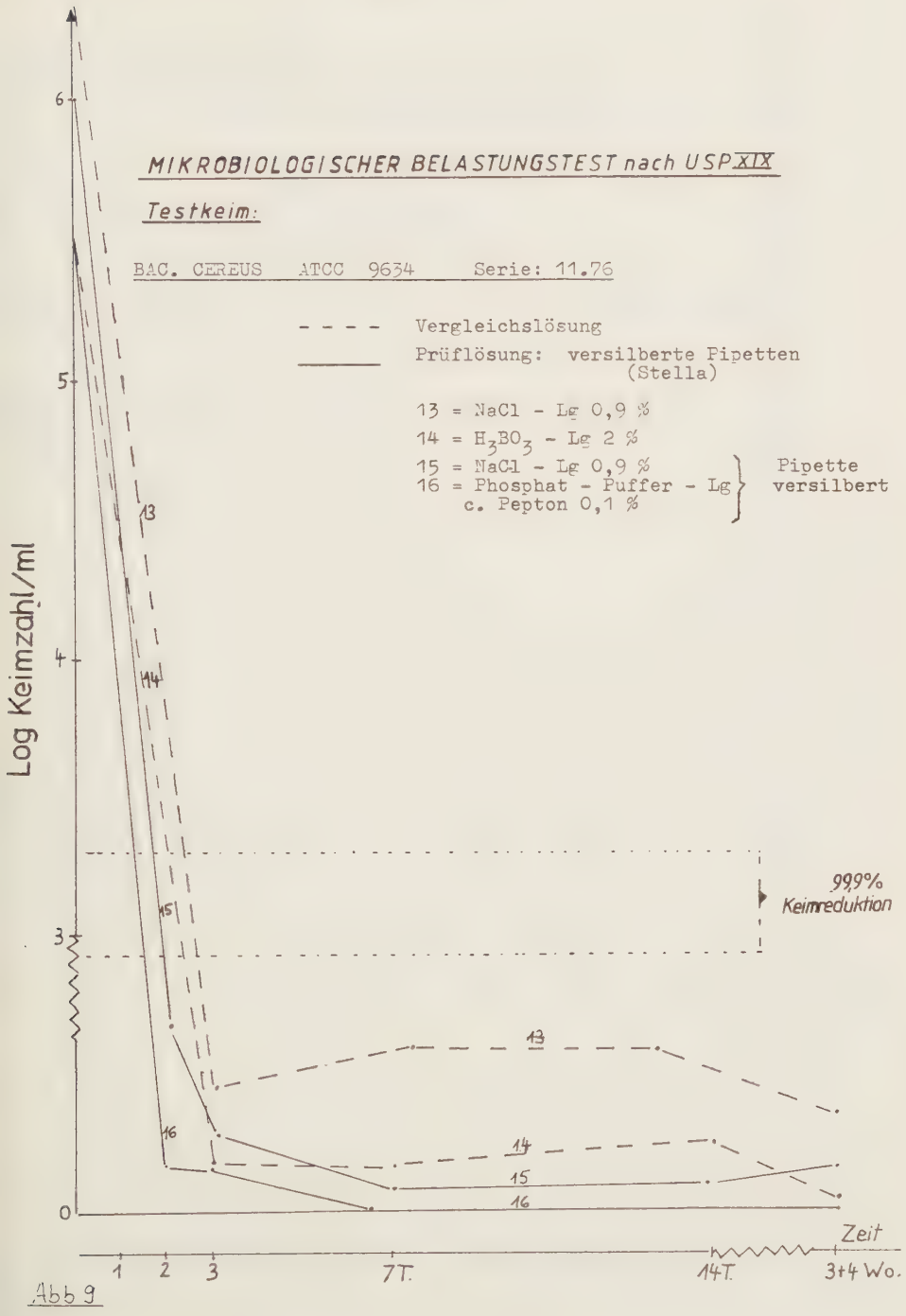



Abb 9

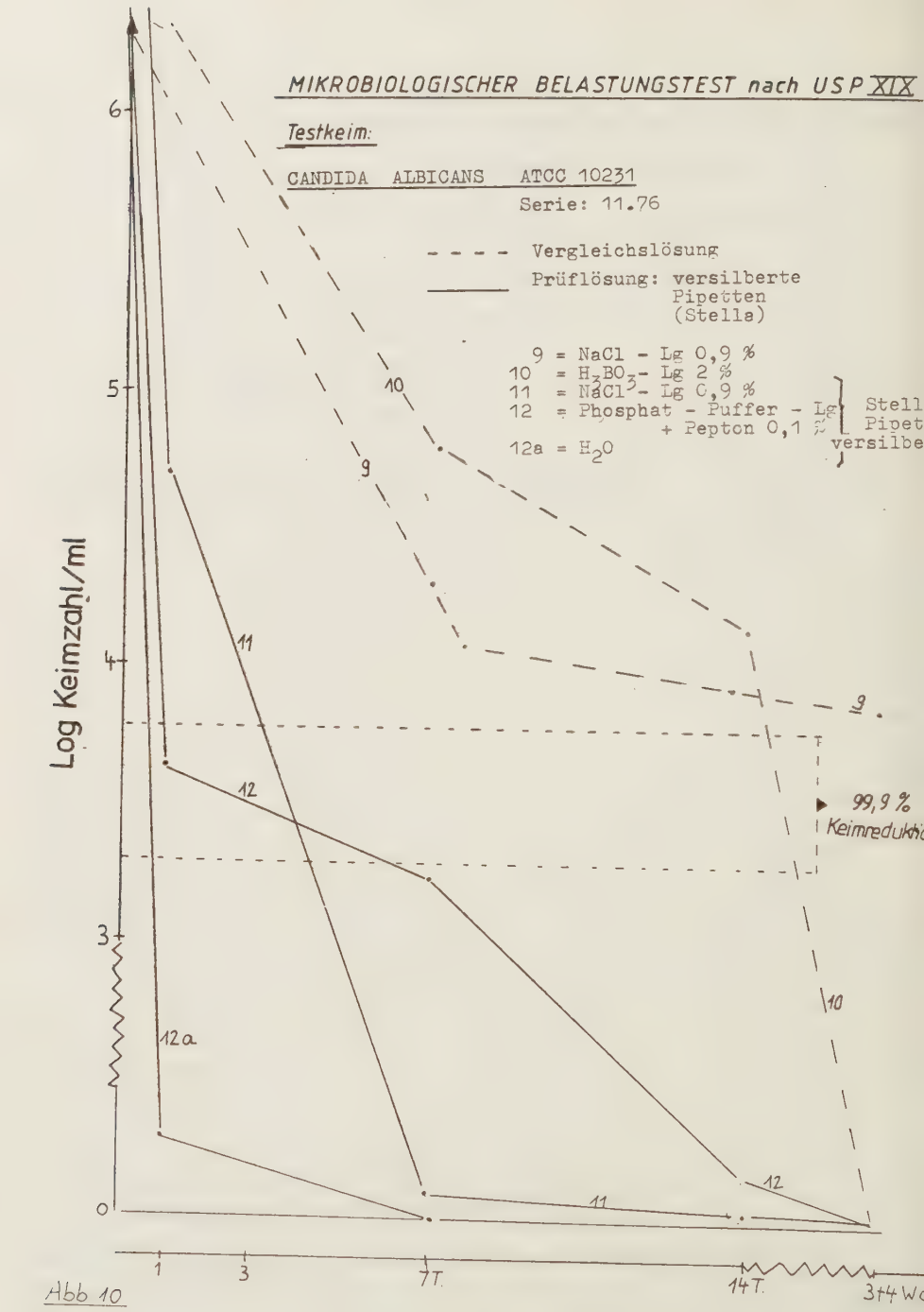

MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX
Testkeim:
CANDIDA ALBICANS ATCC 10231
Serie: 11.76
Vergleichslösung
Prüflösung: versilberte Pipetten (Stella)
9 = NaCl - Lg 0,9 %
10 = $H_3BO_3$ - Lg 2 %
11 = NaCl - Lg 0,9 %
12 = Phosphat - Puffer - Lg + Pepton 0,1 %
12a = $H_2O$
Stell
Pipet
versilbe
Log Keimzahl/ml
6
5
4
3
0
99,9 % Keimreduktio
1
3
7T.
14T.
3+4 We

Abb 10

Keimreduktion von Aspergillus oryzae

Versuche mit Stella-PP-Pipetten versilbert und Ag Cl-Fritte

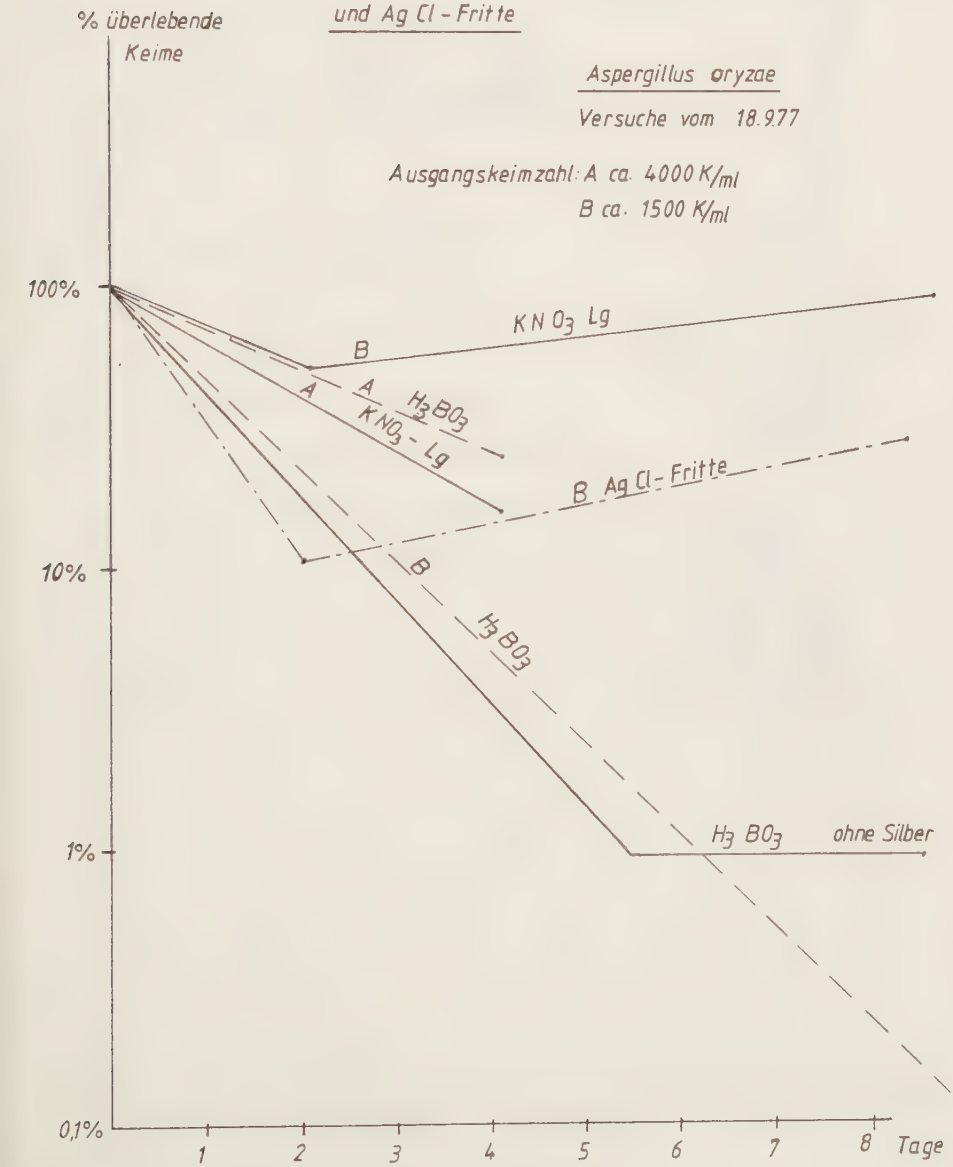



Abb. 11

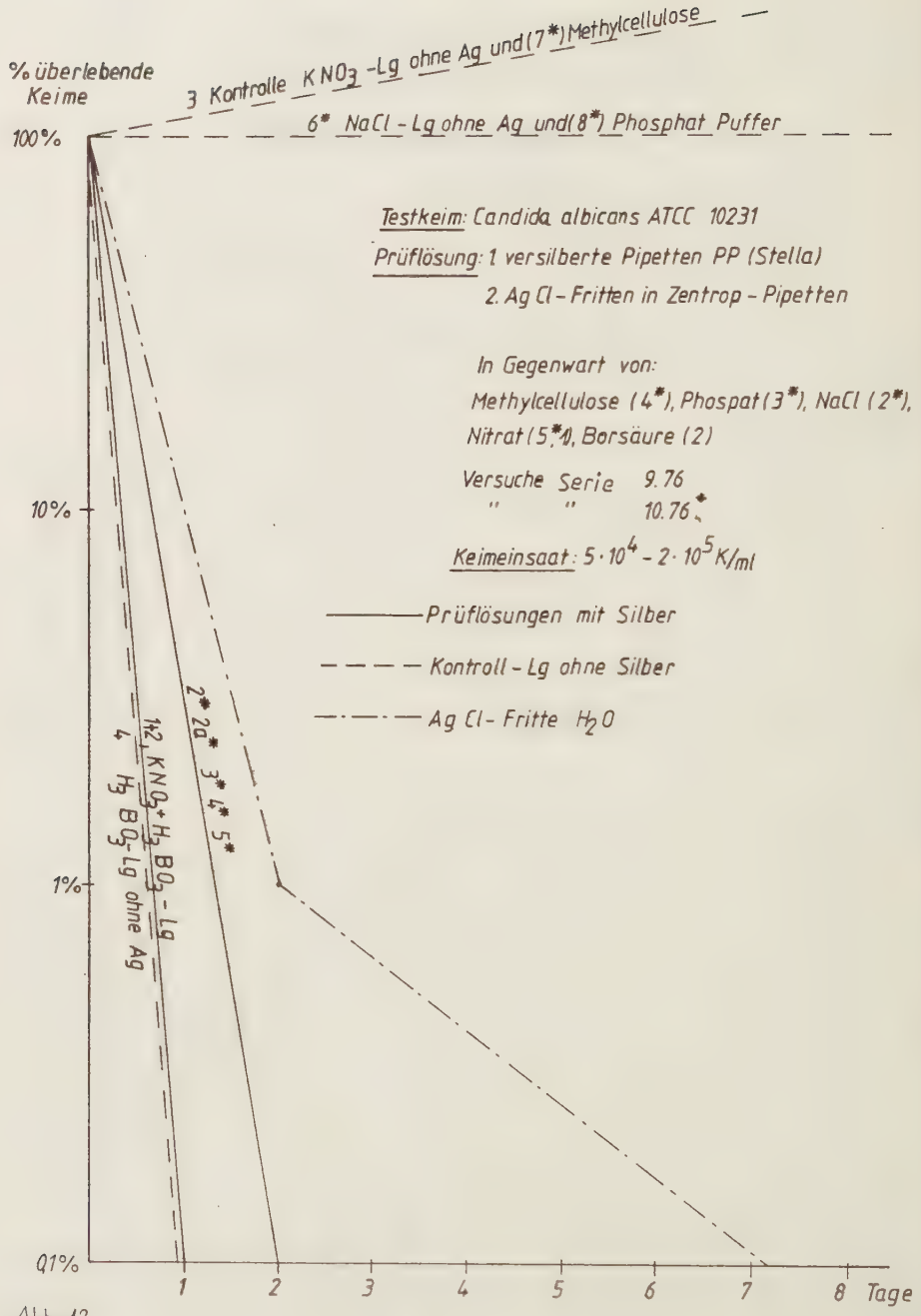

% überlebende Keime
100%
10%
1%
0,1%
3 Kontrolle $KNO_3$ -Lg ohne Ag und (7*) Methylcellulose
6* NaCl - Lg ohne Ag und (8*) Phosphat Puffer
Testkeim: Candida albicans ATCC 10231
Prüflösung: 1 versilberte Pipetten PP (Stella)
2. Ag Cl - Fritten in Zentrop - Pipetten
In Gegenwart von:
Methylcellulose (4*), Phospat (3*), NaCl (2*),
Nitrat (5*,1), Borsäure (2)
Versuche Serie 9.76
" " 10.76*
Keimeinsaat: $5 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^5$ K/ml
Prüflösungen mit Silber
Kontroll - Lg ohne Silber
Ag Cl - Fritte $H_2O$
2* 2a* 3* 4* 5*
1 2 $KNO_3 + H_3BO_3$ - Lg
4 $H_3BO_3$ - Lg ohne Ag
1 2 3 4 5 6 7 8 Tage

Abb 12

## MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

Serie 9.76

**Testkeim:**

1. STAPH. AUR. ATCC 6538
2. BAC. SUBT. ATCC 6633
3. BAC. CEREUS ATCC 9634

**Keimeinsaat:** $\sim 10^7$ : a K/ml — 2 Versuche

$\sim 10^6$ : a+b — 2 Versuche

$5 \cdot 10^3 = \frac{a}{\sim 10^7}$ : b — 1 Versuch

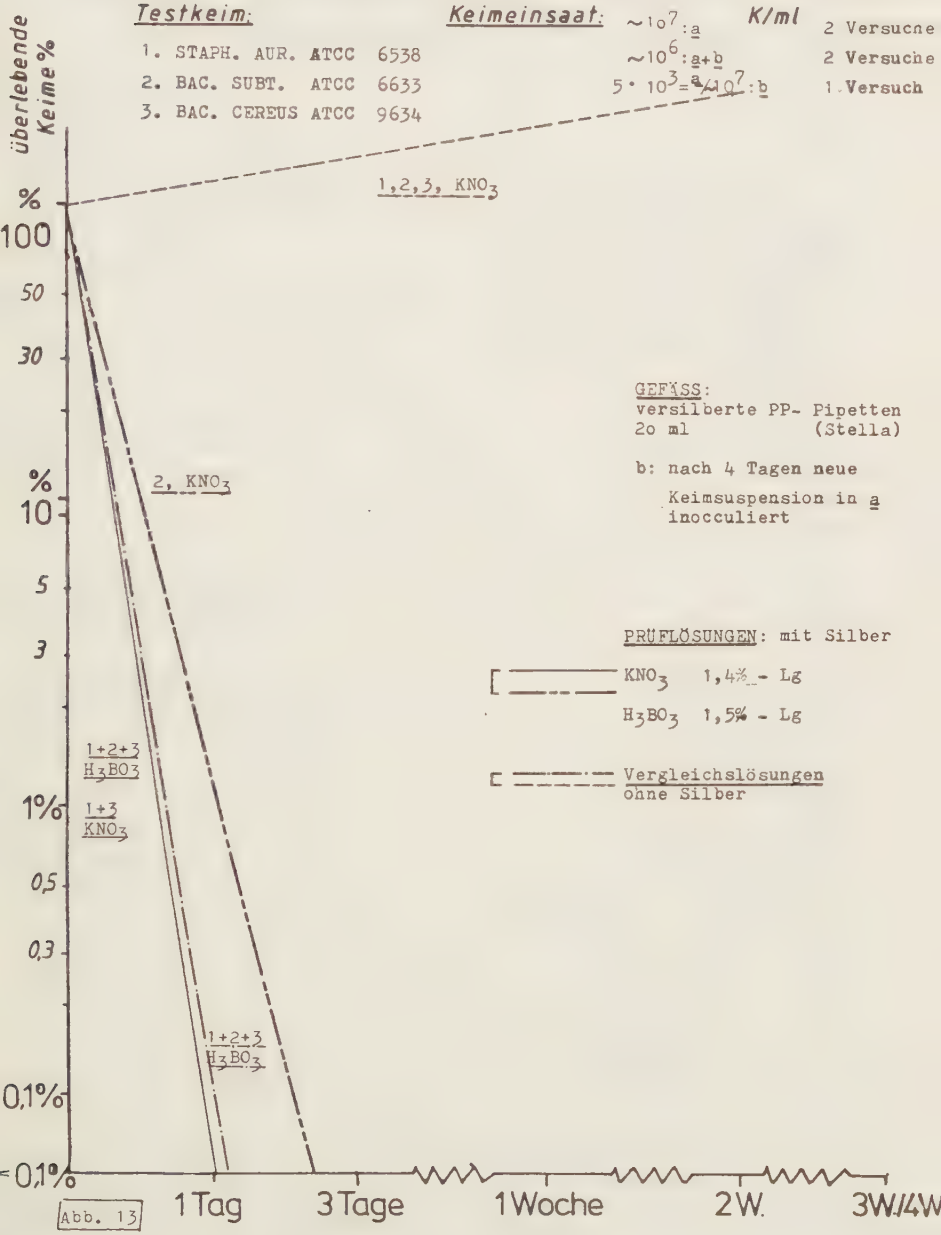



Abb. 13

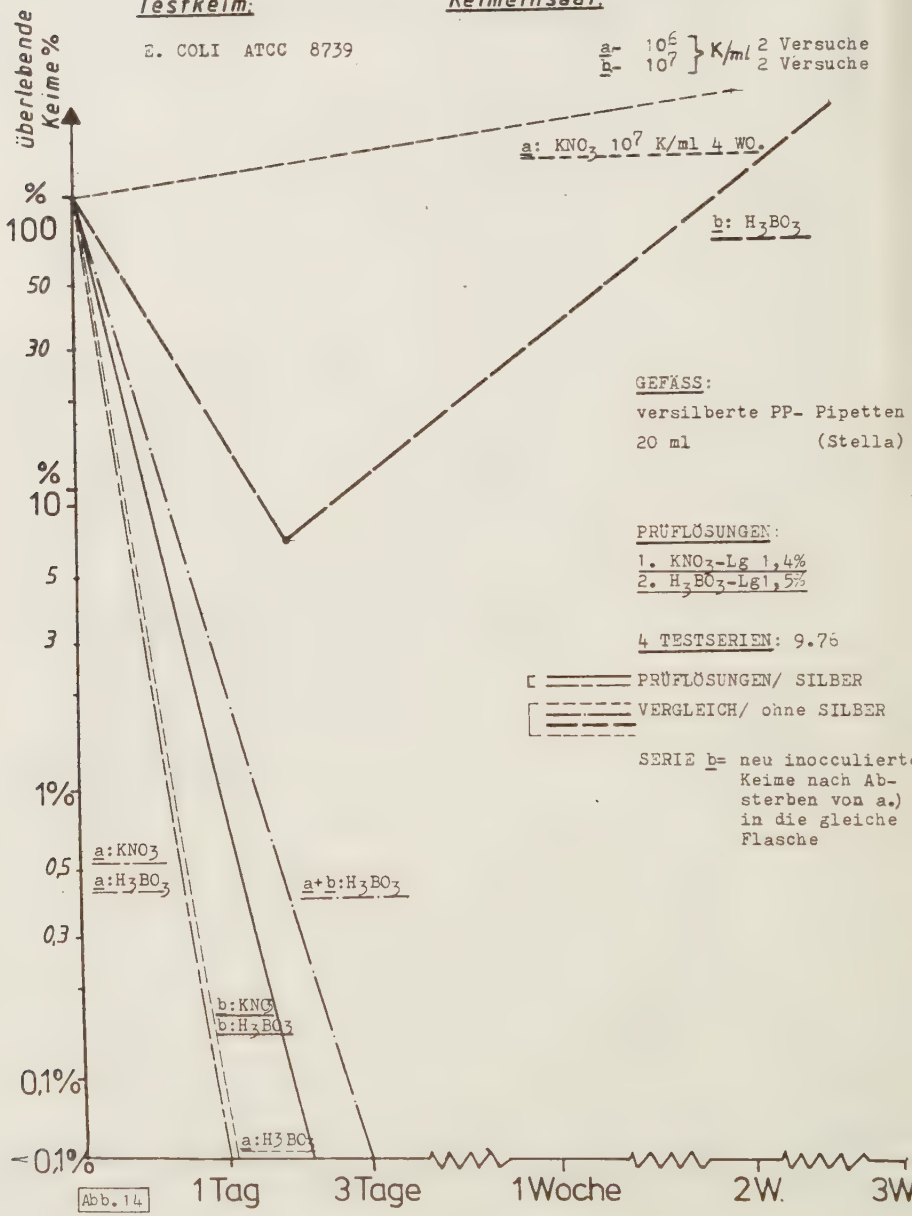
## MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

**Testkeim:**

E. COLI ATCC 8739

**Keimeinsaat:**

a- $10^6$ } K/ml 2 Versuche
b- $10^7$ } K/ml 2 Versuche




GEFÄSS:
versilberte PP- Pipetten
20 ml (Stella)

PRÜFLÖSUNGEN:
1. $KNO_3$-Lg 1,4%
2. $H_3BO_3$-Lg 1,5%

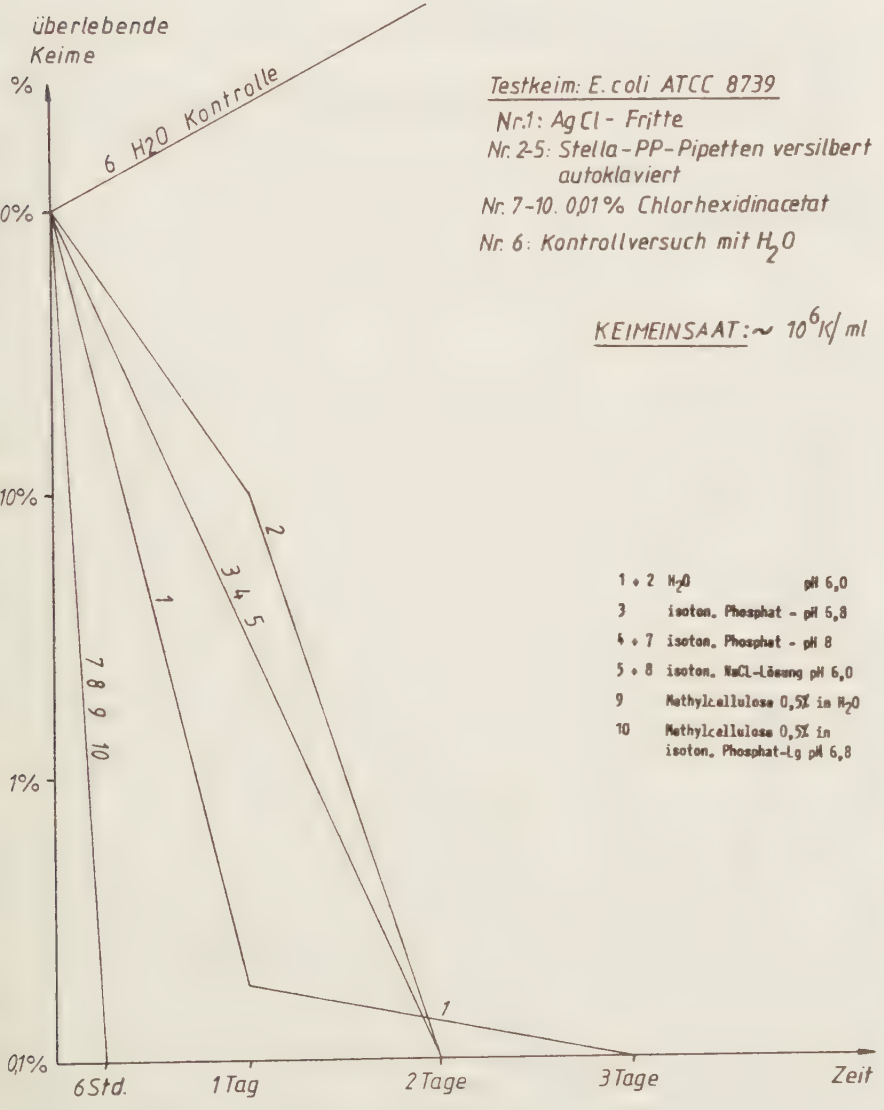
4 TESTSERIEN: 9.76
PRÜFLÖSUNGEN/ SILBER
VERGLEICH/ ohne SILBER

SERIE b= neu inocculierte Keime nach Absterben von a.) in die gleiche Flasche

Abb. 14

Belastungstest mit versilberten Stella-PP-Pipetten Serie: 10.76

und Chlorhexidinacetat in Gegewart von Phosphat, Chlorid, Methylcellulose.




Testkeim: E. coli ATCC 8739

Nr. 1: AgCl - Fritte

Nr. 2-5: Stella-PP-Pipetten versilbert autoklaviert

Nr. 7-10. 0,01% Chlorhexidinacetat

Nr. 6: Kontrollversuch mit $H_2O$

KEIMEINSAAT: ~ $10^6$ K/ml

| | | |
|---|---|---|
| 1 + 2 | $H_2O$ | pH 6,0 |
| 3 | isoton. Phosphat - | pH 6,8 |
| 4 + 7 | isoton. Phosphat - | pH 8 |
| 5 + 8 | isoton. NaCl-Lösung | pH 6,0 |
| 9 | Methylcellulose 0,5% in $H_2O$ | |
| 10 | Methylcellulose 0,5% in isoton. Phosphat-Lg | pH 6,8 |

Abb.: 15

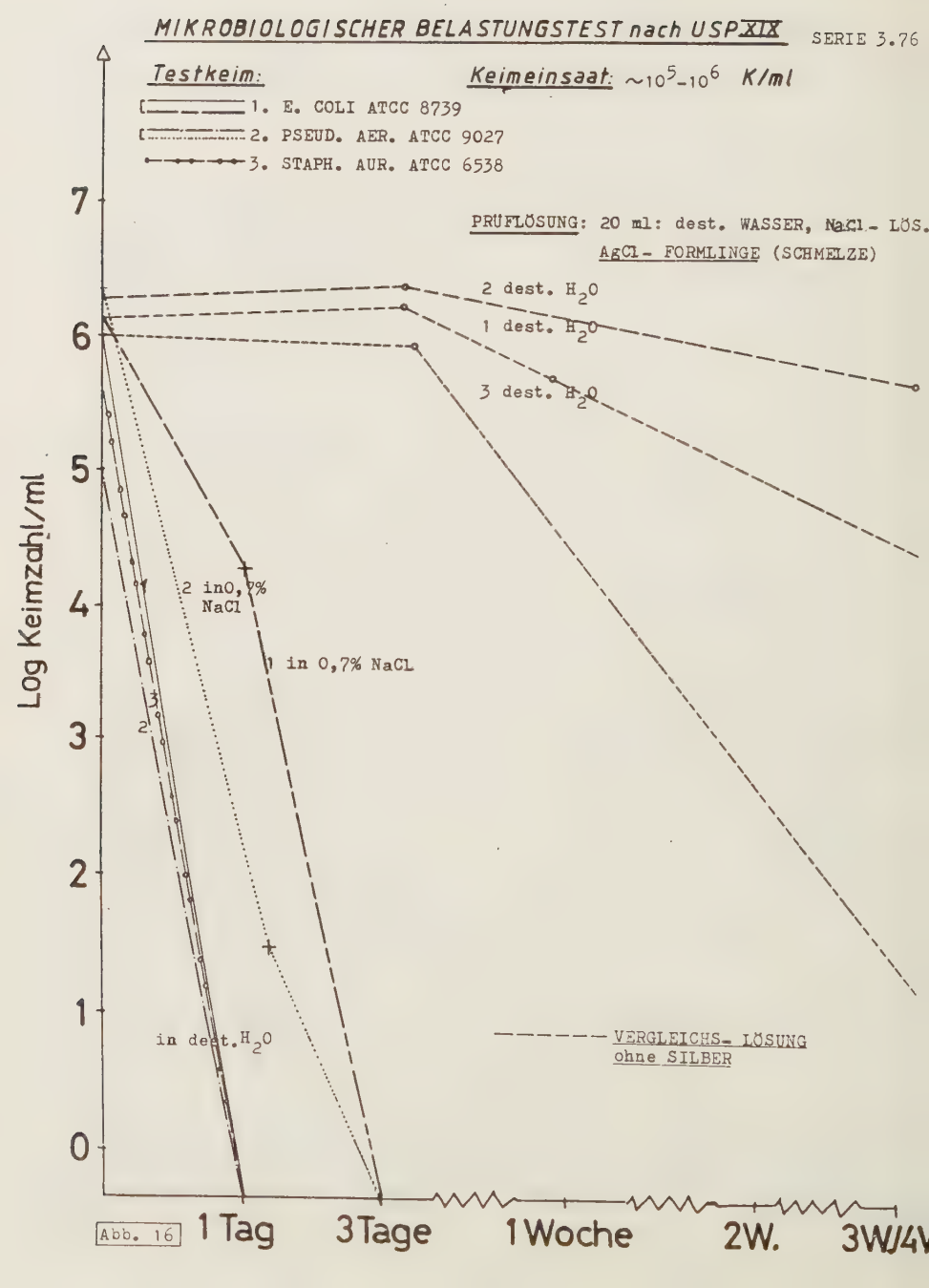

MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX
SERIE 3.76
Testkeim:
Keimeinsaat: ~10^5-10^6 K/ml
1. E. COLI ATCC 8739
2. PSEUD. AER. ATCC 9027
3. STAPH. AUR. ATCC 6538
PRÜFLÖSUNG: 20 ml: dest. WASSER, NaCl - LÖS.
AgCl - FORMLINGE (SCHMELZE)
2 dest. H2O
1 dest. H2O
3 dest. H2O
2 in 0,7% NaCl
1 in 0,7% NaCl
in dest. H2O
VERGLEICHS- LÖSUNG
ohne SILBER
Log Keimzahl/ml
0
1
2
3
4
5
6
7
1 Tag
3 Tage
1 Woche
2W.
3W/4W

Abb. 16

## MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

**Testkeim:** Staph. aur. ATCC 6538 **Keimeinsaat:** $10^6$ K/ml Serie 6.76

**Prüflösung:** 20,0 ml: Zentrop-Flaschen mit AgCl-Formlingen(erstarrte Schmelze)

3, 4, 5 ——————— dest. Wasser

1, 2 —— —— —— Borsäurelösung 2%

6 — — — — " " ohne AgCl-Formlinge

7 ····· Phenylquecksilbernitratlösung 0,002%

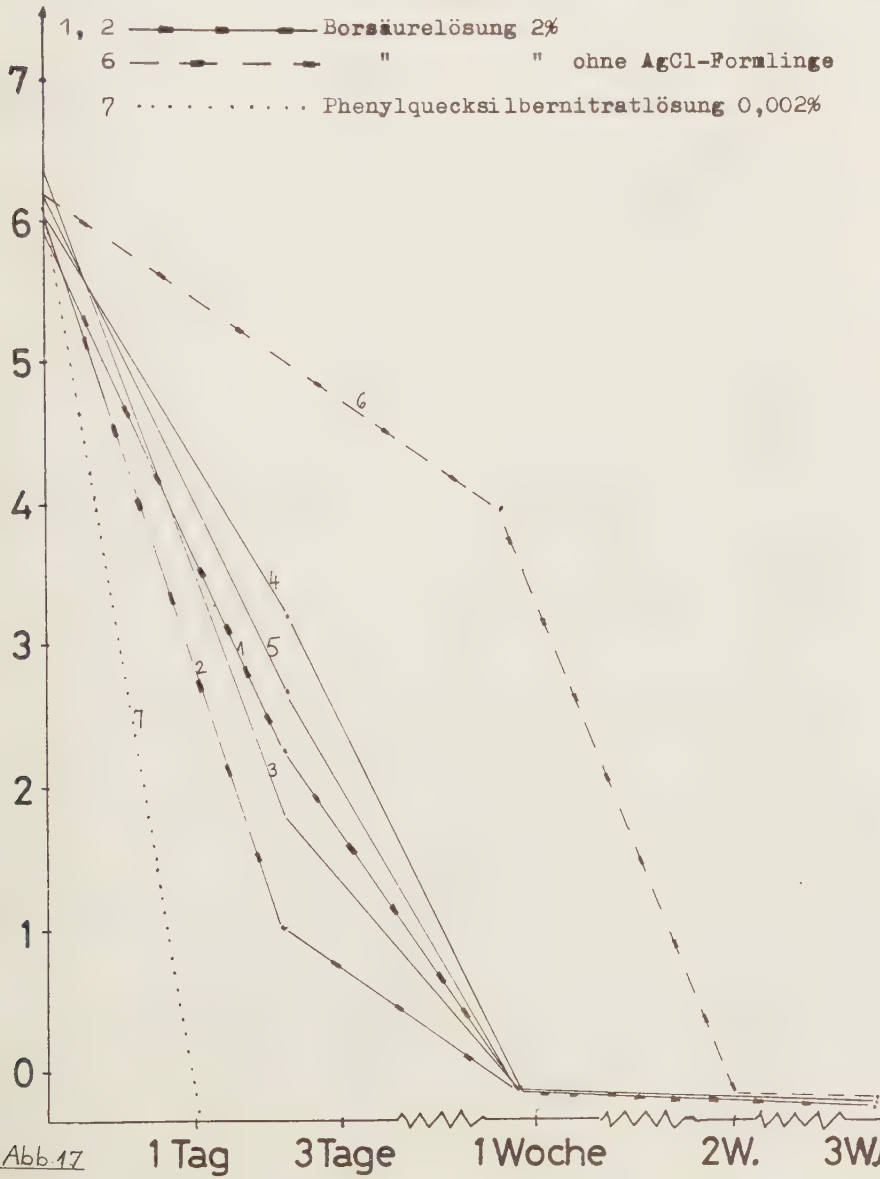



Abb. 17

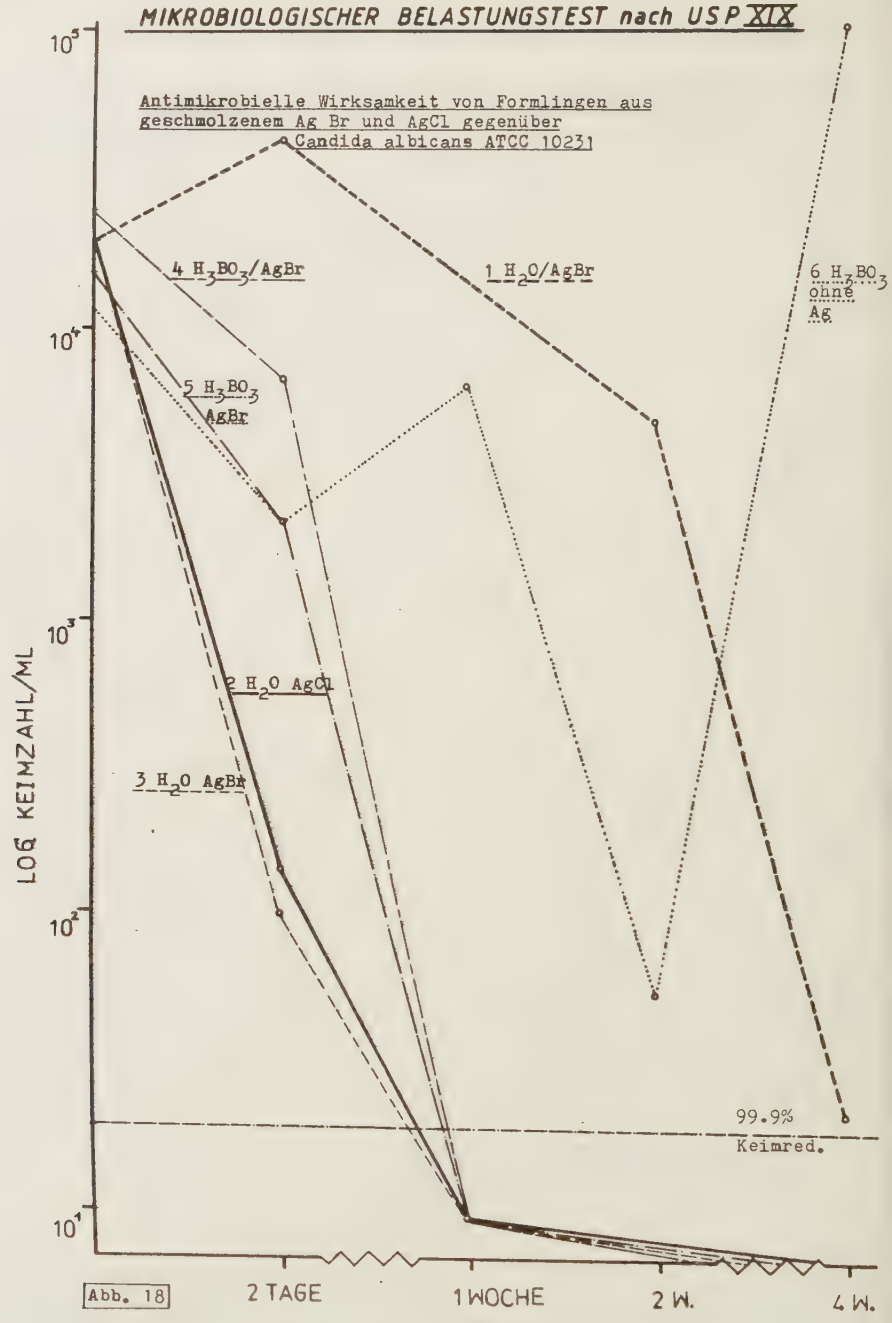

MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX
Antimikrobielle Wirksamkeit von Formlingen aus geschmolzenem Ag Br und AgCl gegenüber Candida albicans ATCC 10231
LOG KEIMZAHL/ML
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
4 H3BO3/AgBr
1 H2O/AgBr
6 H3BO3 ohne Ag
5 H3BO3 AgBr
2 H2O AgCl
3 H2O AgBr
99.9% Keimred.
2 TAGE
1 WOCHE
2 W.
4 W.

Abb. 18

6.2.3 Augentropfen des DAC und andere Formulierungen in verschiedenen Testflaschen mit Silber- oder Silberchlorideinlagen.

6.2.3.1 Wirkstoffhaltige Lösungen, denen Keimsuspensionen einzelner Stämme inoculiert wurden.

Alle hier aufgeführten Untersuchungen wurden nach USP XIX-Richtlinien als Konservierungsmittelbelastungstest durchgeführt, bzw. nach den unter 6.1 genannten Untersuchungsverfahren.
Die Auswahl der Prüflösungen wurde den Bedürfnissen der Praxis angepaßt, so daß häufig applizierte ophthalmologische Wirkstoffe mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum in verschiedenen isotonischen Trägerflüssigkeiten getestet wurden. Dabei interessierte neben dem Einfluß der Trägerlösung auf die oligodynamische Silberwirkung auch die antimikrobielle Eigenaktivität der eingesetzten Wirkstoffe, die sich in der Überlebensfähigkeit der Keime in den Vergleichslösungen zeigte. Die Anzahl der überlebenden Keime während einer Lagerzeit von 4 Wochen ist für die ATCC-Stämme (Nr. 1 - 7) in den Tabellen 11 - 17 dokumentiert. Die mit * bezeichneten Keime sind andere mit in die Testserien einbezogene Stämme von Pseud. aeruginosa, Staph. aureus und Cand. albicans. Ebenfalls aufgezeichnet ist der pH-Wert nach 4-wöchiger Lagerung.
Neben der durch Silber induzierten Absterbegeschwindigkeit der einzelnen Stämme in den verschiedenen wirkstoffhaltigen und wirkstofffreien Lösungen zeigen die aus den Tabellen 11 - 17 exzerpierten und in den Abb. 19 - 21 graphisch dargestellten Prüfungsergebnisse, inwieweit das insgesamt eingesetzte Keimspektrum in ein und derselben Augentropfenformulierung durch Silber innerhalb des Prüfungszeitraums abgetötet wurde.

Prüfbedingungen: Tab. 11 - 16, Testkeime 1 - 6

Entkeimung der Prüflösung: Durch Sterilfiltration oder Dampfsterilisation außerhalb des Prüfgefäßes, dann aseptisch in getrennt sterilisierte Gefäße abgefüllt.
Serie 2.77 wurde im Prüfgefäß autoklaviert.

Lagerung: bei Raumtemperatur liegend oder 3-tägl. kopfstehend (Serie: 2.77 und 5.77).

Inoculation: 2 Tage nach dem Abfüllen der Prüflösung wurden in je 20,0 ml 0,2 ml einer Keimsuspension mit Phosphat-NaCl-Pufferlösung oder Wasser als Dispersionsmittel gegeben.

Prüfgefäße: (A) Zentrop-Flaschen mit Silberchloridring
(B) " " " Silberchlorid-Fritte
(C) versilberte Plastikpipetten (Stella$^{R}$)

Vergleichslösungen: jeweils 20,0 ml von jeder Prüflösung in Gefäßen gleicher Art ohne Silber.

Ergebnisse der Absterberate in Augentropfenformulierungen

(Abb. 19 - 21) Folgende Augentropfen wurden geprüft:

1. Oculoguttae Atropini 1% DAC mit und ohne Methylcellulose
2. verschiedene isotonische Pilocarpinsalzlösungen, davon Pilocarpin-HCl 1% in NaCl-Lösung sowie $NaNO_3$ - Lösung und Pilocarpin-$NO_3$ 1% in $NaNO_3$ - Lösung (alle 3 Lösungen auch mit 1 % Polyvinylalkohol = PVA)
   Pilocarpin-HCl in Borsäurelösung mit Methylcellulose
3. Oculoguttae Tetracaini 1% DAC mit und ohne Methylcellulose
4. " Zinci sulfurici 0,25% DAC
5. " Aethylmorphini 2% DAC
6. " Argenti Albumino-Acetyltannatis 5% (Targesin) DAC

Die Prüfungsergebnisse zeigen insgesamt, daß bei Einsatz der benannten Silberüberzüge als Konservans die an solche Substanzen im Rahmen der USP XIX Richtlinien zu stellenden Anforderungen erfüllt werden. Die strengeren Forderungen nach 99,9% Keimreduktion innerhalb von einer Woche für Bakterien erreichte nur Bac. subtilus in Pilocarpin- und Atropinaugentropfen nicht, und innerhalb von 2 Wochen wurde nur Aspergillus oryzae nicht in der erforderlichen Höhe abgetötet. In diesem Zusammenhang muß besonders hervorgehoben werden, daß es sich bei den Ergebnissen nicht um die Dokumentation einer einzelnen Testserie mit nur einem Stamm handelte, sondern um diejenige vieler Serien, deren Lösungen bei variieren-

den Temperaturen gelagert und auch unterschiedlichen Sterilisationsbedingungen unterworfen wurden. Von daher ist mit den bei mikrobiologischen Versuchen normalen Streuungen zu rechnen. Als eine solche muß auch angesehen werden, daß Cand. alb. in Pilocarpinsalzlösung mit PVA und Testgefäß (A) zu 3% nach 4 Wochen überlebte, während er in der Vergleichslösung nach 1 Woche abgetötet war (Abb. 20 ). Bereits hingewiesen wurde auf die besondere Temperaturabhängigkeit der Silberwirkung ( Kap. 3.5.4 ). Bei den bewußt der Praxis angeglichenen Lagerbedingungen mit jahreszeitlichen Raumtemperaturschwankungen wäre nach (128) bei 30° C mit einer doppelt so hohen Abtötungsgeschwindigkeit wie bei 15° C zu rechnen. Die Augentropfen 3 - 6 wirkten auch ohne Konservierungsmittel mikrobizid auf ATCC-Stämme, wie Abb. 21 zeigt. Außer Cand. alb. wurden alle Keime auch in der Vergleichslösung innerhalb von einer Woche abgetötet. Cand. alb. ist auch in Targesinlösung wesentlich resistenter als die Bakterienstämme. Die antimikrobielle Wirksamkeit von Tetracain in 1%iger wässriger Lösung und Ethylmorphin in 2%iger wässriger Lösung wurde getestet und gegenüber ATCC-Stämmen als sehr hoch befunden (die Versuche sind nicht dokumentiert). Daher kann ausgeschlossen werden, daß allein Borsäurelösung, die als Trägerflüssigkeit für Tetracain-Augentropfen dient, die Keime abtötet. Ebenfalls mit Borsäure bereitet werden Zinksulfat und Atropin-Augentropfen. Atropin wirkt nicht antimikrobiell, Zinksulfat und auch Targesin ist dagegen eine keimhemmende Wirksamkeit zuzurechnen, wobei die Autosterilität von Zinksulfat-Augentropfen auch durch den niedrigen pH-Wert bedingt wird. Da ich auch bei Stadacain eine antimikrobielle Wirkung nachweisen konnte und bei anderen Lokalanaesthetika mit p-Aminogruppierung nicht, könnte die p-Phenoxygruppe für die antimikrobielle Wirksamkeit der Lokalanaesthetika verantwortlich sein. Mehrfach berichtet wird über ähnliche gebaute Lokalanaesthetika vom Typ der "Falicaine" und deren z. T. sehr ausgeprägten mikrobiziden Eigenschaften.[1]

Lokalanaesthetika vom Typ der p- Aminobenzoesäureester können von Mikroorganismen fermetativ zu p- Aminobenzoesäure (PABA)

[1] Proft. E., Chem. Techn. 4, 241 - 46 (1952), idem 5, 13 -19 (1953)

metabolisiert werden, die von Mikroorganismen, welche von der Synthese eigener Folsäure abhängig sind, als Substrat gebraucht wird. Von daher soll die PABA einen wachstumsfördernden Reiz auf die Bakterien ausüben (34). Ob der Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetika vom Tetracaintyp auf einer kompetitiven Hemmung der Folsäuresynthese beruht, (vergl. Sulfonamide) ist nicht bekannt.

In Atropin-Augentropfen wurden die Keime in der Vergleichslösung nicht so schnell wie in der Prüflösung abgetötet, aber immerhin bereits nach 2 Wochen, außer E. coli und Bac. subt.. Diese beiden Keime sind als wenig sensibel gegenüber Milieuänderungen bekannt und vermehren sich auch in Minimalnährmedien. Für die Abtötung ist wohl die Borsäure verantwortlich zu machen, allerdings nimmt ihre mikrobizide Wirksamkeit in Gegenwart von Methylcellulose stark ab, wie die Abb. 19 zeigt. Pseudomonas aeruginosa ist besonders pH-empfindlich, er kann sich bereits in Lösungen von pH 5 nicht mehr vermehren. Wie man sehen kann, zeigte sich in den sauren Atropin- und in verschiedenen Pilocarpinlösungen kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Prüf- und Vergleichslösung. In Gegenwart makromolekularer Hilfsstoffe ließ sich Pseud. aeruginosa nur sehr wenig in seiner Vermehrungsfähigkeit beeinflussen. In jedem Fall wurden die Keime in den silberhaltigen Prüflösungen schneller oder gleichschnell abgetötet als in den Vergleichslösungen, so daß eine mikrobizide Wirkung der Silberverbindungen als nachgewiesen anzusehen ist. Die mitgeprüften nicht standardisierten Stämme verhielten sich nicht anders als die ATCC-Stämme.

6.2.3.2 Wirkstofffreie Lösungen der Formulierungen 6.2.3.1, denen Keimsuspensionen einzelner Stämme inoculiert wurden

Die Versuche mit Hilfsstofflösungen ohne Wirkstoffe wurden bei gleichen Prüfbedingungen innerhalb der gleichen Testserien durchgeführt und sind ebenfalls in den Tabellen 11-17 dokumentiert, wie die in Kap. 6.2.3.1 beschriebenen DAC-Formu-

lierungen. In Abb. 22 sind die nach dem Plattenzählverfahren geprüften Zahlen überlebender Keime Nr. 1 - 5 graphisch als Absterberate dargestellt, in Abb. 23 diejenige von Cand. alb. und Aspergillus oryzae. Als Ziel der Untersuchungen galt es, die Wirksamkeit der "Silberdepots" in den Testflaschen in vielen verschiedenen Trägerflüssigkeiten für Augentropfen und insbesondere in denjenigen der Formulierungen des Kap. 6.2.3.1 unter Ausschluß evtl. selbst antimikrobiell wirkender Arzneistoffe zu prüfen.

Ergebnis

In allen Testflaschen (C) mit versilberten Pipetten wurden die Keime innerhalb von einer Woche um mehr als 99,9% reduziert. Diese Flaschen zeigten sowohl an dieser Stelle wie auch bei anderen Versuchen eine gewisse Überlegenheit gegenüber Silberchloriddepots (A) und (B). Die Ergebnisse in den Testflaschen (A) und (B) fielen bei chlorid- und phosphat-haltigen Lösungen nicht immer erfolgreich aus. Ungenügend reduziert wurde Pseud. aer. in NaCl-Lösung in einer Serie (in einer zweiten Serie ausreichend). Bei diesem Keim konnte in NaCl-Lösung mit PVA und Gefäß (B) innerhalb von 4 Wochen überhaupt keine Keimreduktion erreicht werden (100% Überlebende). Auf eine besonders gute Vermehrungsfähigkeit von Pseud. aer. in Gegenwart makromolekularer Hilfsstoffe in Kombination mit Chloridionen wurde bereits hingewiesen. Bac. subt. überlebte 2 Wochen lang in NaCl-Lösung und Phosphat-Pufferlösung zu mehr als 0,1%. Aspergillus oryzae und Cand. alb. wurden nach USP XIX Anforderungen ausreichend gehemmt. Jedoch wurde eine Keimreduktion von 99,9% innerhalb von 2 Wochen bei Aspergillus oryzae in keinem Fall erreicht, während die Abtötungsraten von Cand. alb. in phosphat- und chloridhaltigen Lösungen bei den verschiedenen Serien Schwankungen unterlagen, die aus der Abb. 23 und Tab. 16 zu entnehmen sind. Die Mehrzahl der Keime war nach einer Woche um mehr als 99,9% reduziert. Borsäure-Lsg. allein wirkte nicht immer ausreichend mikrobizid. Bac. subt. überlebte mit ca. 5%, in den gesilberten Borsäurelösungen, dagegen waren nach einer Woche weniger als 0,1% überlebende Keime nachweisbar. Auch Staph. aur.* (0124) wurde in Borsäure-

Vergleichslösung ungenügend abgetötet. Die Empfindlichkeit von Cand. alb. gegenüber Borsäure variierte, denn wie Tab. 23 zeigt, waren bereits nach einem Tag nur noch weniger als 0,1% überlebende Keime nachweisbar, während bei anderen Testserien eine weitgehende Unempfindlichkeit gegenüber Borsäure gefunden wurde. Daraus läßt sich erkennen, daß die Autosterilität borsäurehaltiger Trägerflüssigkeiten nicht ausreichend abgesichert ist und die Silberung auch solcher Lösungen als sinnvoll anzusehen ist.

Methylcelluloselösungen Tab. 10 und Abb. 24

Methylcellulose zweier verschiedener Handelsqualitäten wurden in unterschiedlicher Konzentration in Wasser oder NaCl-Lösung gelöst. die Lösungen wurden mit besonderer Sorgfalt von Schwebstoffen befreit, um Silberverluste durch Adsorption vorzubeugen. Mit der Qualität "Methocel E4 M premium" wurden klare schwebstofffreie Lösungen erhalten, während bei der Qualität "Methocel MC 1500" auch nach bestmöglicher Filtration manchmal leichte Trübungen durch unvollständig gelöste Partikel zu erkennen waren. Die Substanzmenge der Qualität " E 4 M premium" kann wegen der höheren Viskosität gegenüber MC 1500 auf ca. 1/5 herabgesetzt werden, wodurch die in Konkurrenz zu den Bakterien an Methylcellulose adsorbierte Silbermenge wahrscheinlich kleiner sein wird.
Die Versuchsergebnisse zeigten eine bessere Silberwirksamkeit in Lösungen mit der erstgenannten Qualität. Nur in einem Fall wurde bei Cand. alb. nicht die gewünschte Keimreduktion erreicht. Selbst der sonst in makromolekularen Hilfsstofflösungen besonders gut wachsende Pseud. aeruginosa wurde nach 3 Tagen abgetötet. Beste Ergebnisse konnten wiederum mit den Testflaschen (C) erzielt werden.
Die Behinderung der Silberwirkung wird also durch die gelöste Menge und die Reinheit der Handelsqualität positiv zu beeinflussen sein.

6.2.3.3 Wirkstoffhaltige und wirkstofffreie Lösungen, denen Keimsuspensionen mehrerer Keimarten und Stämme als Mischsuspension inoculiert wurden (Prüfbedingungen wie 6.2.3.1).

1. Mischsuspensionen verschiedener Keimarten (Tab. 18 und 19)

Die Stämme: E. coli ATCC 8735
Pseud. aer. ATCC 9027
Staph. aur. ATCC 6538
und ein Enterobacter-Wildstamm (häufig als Sekundärkontaminant gefunden)

wurden getrennt angezüchtet und als Mischsuspension, die etwa gleiche Mengen jeder Species enthielt, in die Prüflösung inoculiert, so daß diese zu Versuchsbeginn ca. $1{,}7 \cdot 10^6$ Keime/ml enthielt. Die Prüflösungen sind in Tab. 18, die Vergleichslösungen in Tab. 19 benannt. Es handelt sich in erster Linie um 1%ige isotonische Pilocarpin-HCl und Pilocarpin-$NO_3$ - Lösungen mit verschiedenen Isotoniezusätzen wie NaCl, $NaNO_3$, $H_3BO_3$ sowie makromolekularen Hilfsstoffen wie Methylcellulose und Poyvinylalkohol, daneben um Zinksulfat-Augentropfen DAC.

Ergebnisse

In allen Augentropfenformulierungen wurden nach 3 Tagen nur noch weniger als 0,1% überlebende Keime gefunden. Bei der hohen Keimeinsaat muß das als ein sehr gutes Ergebnis angesehen werden, besonders auch im Hinblick auf die Keimreduktion in Gegenwart der makromolekularen Hilfsstoffe, welche ja die antimikrobielle Wirkung von Silberionen hemmen sollen. Die in Zinksulfat-Augentropfen erreichte Keimreduktion bestätigt noch einmal die bereits erwähnte Autosterilität der Lösung. Bei den isotonischen Trägerflüssigkeiten mit PVA und Methylcellulose liegen die Ergebnisse nicht so eindeutig (Lsg. ohne Pilocarpinsalze). In den Testflaschen (C) wurden nach einer Woche nur noch 0,1% oder weniger überlebende Keime gefunden, bei allen Prüflösungen der Testflaschen (A) dagegen war der Keimgehalt noch nach 4 Wochen ca. 100%. In diesen Lösungen überlebte fast ausschließlich Pseud. aeruginosa.

Die Überlegung liegt nahe, ob Pilocarpinsalze antimikrobielle Eigenschaften haben, insbesondere gegenüber Staph. aureus und Pseud. aeruginosa, denn in den Pilocarpin-Vergleichslösungen der Tab. 19 ($V_{11-12}$) und der Tab. 11 und 12 waren die Keime innerhalb von 3 - 7 Tagen abgetötet. Das Gegenteil könnte man feststellen, wenn man die Absterberate in den Vergleichslösungen $V_1$ - $V_6$ der Tab. 19 betrachtet, denn hier wird höchstens eine geringfügige Keimreduktion in Pilocarpinlösung erreicht. Demnach muß bei diesen Keimen die Frage offen bleiben, inwieweit Pilocarpin- oder Silbersalze für die Keimreduktion in der Prüflösung verantwortlich sind.

2. Mischsuspensionen verschiedener Stämme einer Keimart

Von jeder Keimart wurden 4 verschiedene Stämme (keine ATCC-Stämme) getrennt angezüchtet und wie unter 1. beschrieben als Mischsuspension inoculiert.
In Tab. 20 und 21 sind die Ergebnisse mit den Prüfkeimen E. coli, Pseud. aer. und Staph. aur. aufgezeichnet.
Als Prüflösungen (Nr. 1 - 4) wurden 1%ige isotonische Pilocarpinsalzlösungen sowie (Nr. 5 - 8) isotonische Hilfsstofflösungen mit NaCl, Methylcellulose und Polyvinylalkohol eingesetzt.
In allen Pilocarpinsalzlösungen war die Zahl der überlebenden Keime nach 1 Woche $< 0,1\%$. In den Hilfsstofflösungen Nr. 5 - 8 wurden die Stämme von Staph. aur. in gleicher Weise abgetötet, E. coli in 3 Fällen und Pseud. aer. nur in einem Fall. Eine unterschiedliche Wirksamkeit bei den Testflaschen (A) und (C) war nicht zu erkennen.
In den Vergleichslösungen überlebten alle Keime zu mehr als 1% innerhalb von 4 Wochen, mit Ausnahme von Staph. aur. in Methocel-Lösung ($V_{5-6}$).
Tab. 22 zeigt im Versuch (A) die Prüfungsergebnisse mit 3 verschiedenen Stämmen von Candida albicans, getestet mit 3 Prüflösungen in den Testflaschen (A). In PVA-Lösung wurde nur 10% Keimreduktion nach 4 Wochen erreicht, in Zinksulfat und isotonischer $NaNO_3$-Lösung 99,9% nach 3 - 7 Tagen.
Der Stamm Cand. alb. "Marburg" wurde im (B)-Versuch in Wasser

durch 30 - 75 µg $Ag^{+}$ /l (als $AgNO_3$) innerhalb von einer Woche abgetötet. In den Vergleichslösungen überlebten die Stämme um z.T. mehr als 100% nach 4 Wochen.
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß auch nicht standardisierte Stämme der vorgeschriebenen Prüfkeime durch die "Silberdepots" in den Testflaschen in zumindest gleichem Ausmaß abgetötet wurden wie die ATCC-Stämme. Eine größere Empfindlichkeit der ATCC-Stämme innerhalb des Prüfungszeitraums von einer Woche ließ sich nicht nachweisen.

Die Pseud. aeruginosa-Stämme wurden in Gegenwart makromolekularer Hilfsstoffe nur in einer von 4 Hilfsstofflösungen ausreichend reduziert.

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

1 *Testkeim:* E.coli ATCC 8735 *Keimeinsaat:* $2.10^6 - 10^6$ K/ml 4 Serien
$4.10^6$ " 1 Serie (2.

*überlebende Keime nach*

| Nr. ml | Prüflösung | G | M | 1 Tag K/ml | 3 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3+4 Wo. K/ml | % Überleb. Keime | pH nach 4 Wo | Serie Nr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Augentropfen - Formulierungen | | | | | | | | | | | |
| 1 | Atropin 1% Augentr. DAC | C | II +IV | | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% 3T | 5,0 | 8.77 |
| 2 | Atropim 1% DAC c.Methylzellulose | C | II +IV | | <10 | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% 3T | 5,4 | 2.77 |
| 3 | Ethylmorphin 2% Augentr. DAC | A | II +IV | < 10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% 1T | 5,5 | 9.77 |
| 4 | Pilocarpin-HCl 1% | A | | ~20 | < 10 | < 10 | | < 10 | < 0,1% 1T | 5,4 | |
| 5 | in NaCl-Lg 0,7% | A | II+ | < 10 | < 10 | < 10 | | < 10 | < 0,1% 1T | 5,3 | 9.77 |
| 6 | | B | IV | < 10 | | $3.10^3$ | | $2.10^3$ | > 0,1% 1Wo | 5,5 | |
| 7 | Pilocarpin HCl 1% | A | II | < 10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% 1T | 5,4 | 8.77 |
| 8 | in $NaNO_3$-Lg 1% | B | +IV | < 10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% 1T | 5,5 | |
| 9 | Pilocarpin-$NO_3$ 1% in $NaNO_3$-Lg 1% | A | II +IV | < 10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% 1T | 5,1 | 8.77 |
| 10 | Pilocarpin-$No_3$ 1% in $NaNO_3$-Lg 1% + 1% PVA | A | | $6.10^3$ | $2.10^2$ | < 10 | | < 10 | < 0,1% 3T | 5,4 | 9.77 |
| 11 | Pilocarpin-HCl 1% + PVA 1,5% in NaCl-Lg isot. | A | " | 250 | <10 | < 10 | | < 10 | < 0,1% 1T | 5,4 | 9.77 |
| 12 | Pilocarpin-HCl 1% +Methocel E4MO,1% in $H_3BO_3$-Lg isot. | A | " | 1350 | <10 | < 10 | | <10 | < 0,1% 1T | 4,5 | 9.77 |
| 13 | Targesin 5% Augentr. DAC | A | I+ IV | < 10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% 1T | 6,0 | 9.77 |
| 14 | Tetracain 1% Augentr. DAC | C | I+ IV | < 10 | | <10 | < 10 | < 10 | < 0,1% 1T | 5,2 | 2.77 |
| 15 | PVA 1% in 0,7% Natriumchlorid-Lg | A | " | < 10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% 1T | 5,8 | 10.7 |
| 16 | Natriumchlorid-Lg 0,7% | A | " | < 10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% 1T | 5,5 | 10.7 |
| | | | | Vergleichslösungen ohne Silber | | | | | | | |
| V11 | Atropim 1% Augentr. DAC | | II+I | | | $5.10^4$ | $2.10^4$ | | > 1% 1Wo | 5,0 | 2.77 |
| V2 | Atropin 1% +Methylcellulose | | II+I | | | $6.10^5$ | $6.10^5$ | | >10% 2Wo | 5,5 | 2.77 |
| V3 | Ethylmorphin 2% Augentr.DAC | | II +IV | < 10 | | <10 | <10 | | < 0,1% 1T | 5,5 | 9.77 |
| V7 | Pilocarpin-HCl 1% in $NaNO_3$-Lg 1% | | II | | $17.10^5$ | | $10^5$ | $10^3$ | 5% 2Wo | 5,5 | 8.77 |
| V9 | Pilocarpin-$NO_3$ 1% in $NaNO_3$-Lg 1% | | II | $2.10^6$ | | | $2.10^5$ | | 10% 2Wo | 5,2 | 8.77 |
| V10 | Pilocarpin-$NO_3$ 1% in $NaNO_3$-Lg 1% + 1% PVA | | II | $9.10^5$ | $15.10^6$ | | $10^6$ | $10^6$ | 50% 4Wo | 5,5 | 9.77 |
| V13 | Targesin 5% Augentr. DAC | | I+II +IV | <10 | | < 10 | <10 | | < 0,1% 1T | 6,0 | 9.77 |

Nährmedien: (M) + 0,25% Na.-Thioglycolat Gefäße: (G)

Tab.: 11

I CASO-Agar
II Mac CONKEY-Agar
III Sab.- Maltose-Agar
IV CSB-Bouillon
V Sab.-Maltose-Bouillon

A Silberchlorid-Ring Zentrop-Flasche
B Silbercholrid-Fritte
C versilberte Pipette Stella-Flasche

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

2 *Testkeim:* Pseud.aer.ATCC 9027 *Keimeinsaat:* $10^6$ *K/ml* 3 Serien; $3.10^6$ " " 1 Serie (2.77

*Pseud.aer.3554: $3,3.10^5$ K/ml *Überlebende Keime nach*

| Nr. al | Prüflösung 2,0 | G | M | 1 Tag K/ml | 3 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3+4 Wo. K/ml | % überleb. Keime | | pH-Wert nach 4 Wo | Serie Nr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Augentropfen-Formulierungen** | | | | | | | | | | | |
| 1 | Atropin 1% | C | | | | < 10 | < 10 | 10 | < 0,1% | 1Wo | 5,0 | 2.77 |
| 2 | Augentr. DAC | C | | | | < 10 | < 10 | 10 | " | " | | |
| 3 | Atropin 1% DAC | C | " | | | < 10 | < 10 | 10 | " | " | | |
| | Augentr. C.O,5% | | | | | | | | | | | |
| 4* | Methylcellulose | C* | | | | < 10* | <10* | <10* | * " | " | 5,3 | 2.77 |
| 5 | Ethylmorphin 2% Augentr. DAC | A | " | < 10 | | | <10 | 10 | " | 1T | 5,5 | 9.77 |
| 6 | Pilocarpin HCl 1% | A | | 200 | 10 | < 10 | | < 10 | " | 1T | 5,3 | |
| 7 | in Na Cl-Lg 0,7% | A | " | 750 | 250 | < 10 | | < 10 | " | " | 5,3 | 9.77 |
| 8 | | A | | < 10 | | < 10 | | < 10 | " | " | 5,3 | |
| 9 | Pilocarpin HCl 1% | A | | < 10 | | < 10 | | < 10 | " | " | 5,3 | |
| 10 | in $NaNO_3$-Lg 1% | B | " | < 10 | | < 10 | | < 10 | " | " | 5,3 | 9.77 |
| 11 | Pilocarpin-$NO_3$ 1% in $NaNO_3$-Lg 1% | A | " | 200 | | < 10 | | < 10 | " | " | 5,1 | 9.77 |
| 12 | Pilocarpin-$NO_3$ 1% in $NaNO_3$-Lg 1% mit PVA 1% | A | | 970 | | < 10 | | < 10 | " | " | 5,4 | |
| 13 | Pilocarpin-HCl 1% Methocel E4M.C,1% | C | | $10^3$ | | < 10 | | < 10 | " | " | 5,0 | 9.77 |
| 14 | Borsäure-Lg isoton. | A | " | < 10 | | < 10 | | < 10 | " | " | 6,0 | 9.77 |
| 15 | Targesin 5% Tr DAC | A | " | < 10 | | < 10 | | < 10 | " | " | 5,0 | 2.77 |
| 16 | Tetracain 1% | C | " | < 10 | | < 10 | | < 10 | " | " | | |
| 17* | Augentr. DAC | C* | " | < 10* | | < 10* | | < 10* | * " | " | | |
| 18 | Zinksulfat 0,25% Augentr. DAC | A | " | < 10 | | < 10 | | < 10 | " | " | 4,8 | 8.77 |
| | **Hilfsstoffe** | | | | | | | | | | | |
| 19 | Natriumchlorid | A | | $10^6$ | $5.10^4$ | $10^5$ | $10^5$ | - | 10% | 2Wo | 5,5 | |
| 20 | Lösung 0,7% | C | " | $5.10^3$ | 10 | | < 10 | < 10 | < 0,1% | 1T | 5,5 | 10.77 |
| 21 | PVA 1% in Natriumchlorid 0,7% | B | " | $10^6$ | $10^6$ | $10^6$ | | $10^6$ | 100% | 4Wo | 5,9 | 10.77 |
| 22 | Methocel E4MO,1% "premium" in dest. $H_2O$ | C | " | < 10 | < 10 | | < 10 | < 10 | < 0,1% | 1T | 5,8 | 10.77 |
| | **Vergleichslösungen ohne Silber** | | | | | | | | | | | |
| V 1 | Atropin 1% | | I+ | | | < 10 | 10 | | < 0,1% | 1Wo | 5,0 | 2.77 |
| V 2* | Augentr. DAC | | IV | | | *1470 | *20 | | *< 0,1% | 2Wo | | |
| V 3 | Atropin 1% DAC | | " | | | $10_5$ | $10_5$ | | < 0,1% | 1Wo | 5,3 | 2.77 |
| V 4 | c.Methylcellulose 0,5% | | | | | $10^5$ | $10^5$ | | 70% | 2Wo | | |
| V 9 | Pilocarpin HCl 1% in $NaNO_3$-Lg 1% | | " | | 800 | 370 | 20 | Wachst. in IV | < 0,1% | 3T | 5,3 | 9.77 |
| $V_{10}$ | Pilocarpin HCl 1% +PVA 1,5% in isoton. NaCl-Lg | | " | $4.10^4$ | 100 | < 10 | 10 | 10 | " | " | 5,4 | 9.77 |
| $V_{15}$ | Targesin-Lg 5% Augentr. DAC | | " | < 10 | | | 10 | | < 0,1% | 1T | 6,0 | 9.77 |
| V16 | Tetracain 1% | | " | < 10 | | < 10 | 10 | | " | " | 5,0 | 2.77 |
| V17* | Augentr. DAC | | " | * 10 | | < 10 | 10 | | * " | " | | |
| $V_5$ | Ethylmorpin 2% Augentr. DAC | | " | < 10 | | < 10 | 10 | | " | " | 5,5 | 9.77 |
| $V_{18}$ | Zinksulfat 0,25% Augentr. DAC | | " | $10^5$ | < 10 | < 10 | | 10 | " | 3T | 4,8 | 8.77 |
| $V_{21}$ | PVA 1% in 0,7% Natriumchlorid | | " | $10^6$ | $3.10^6$ | | $10^6$ | $10^6$ | 100% | 4Wo | 5,9 | 10.77 |

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

3 *Testkeim:* Staph. aur. ATCC 6538 *Keimeinsaat:* $2.10^6$-$10^6$ K/ml 4 Testseri

* Staph. aur. 0124 *überlebende Keime nach*

| Nr. ml | Prüflösung 2% | G | M | 1 Tag K/ml | 3 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3+4 Wo. K/ml | % überleb. Keime | | pH-Wert nach 4 Wo | Serie Nr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1+1* | Atropin-Augentr. | A* | | 320* | | < 10* | | < 10* | < 0,1%* | 1T | | 5.7 |
| | | A | I+N | < 10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% | 1T | 5,2 | 5.7 |
| 2 | DAC 1% | C | I | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% | 1T | | 2.7 |
| 3 | Atropin Augentr. DAC 1% Methylcellulose Methocel 1500* o,5% | C | I+ IV | $2.10^6$K | | $10^3$ | < 10 | < 10 | < 0,1% | 1Wo | 5,5 | 2.7 |
| 4 | Aethylmorphin 2% Augentropfen DAC | A | I+ IV | < 10 | < 10 | | | < 10 | < 0,1% | 1T | 5,3 | 9.7 |
| 5 | Pilocarpin HCl 1% | B | I | 3000 | < 10 | < 10 | | < 10 | < 0,1% | 3T | 5,6 | |
| 6 | in NaCl-Lg 0,7% | A | +IV | 150 | < 10 | < 10 | | < 10 | < 0,1% | 1T | 5,2 | |
| 7 | Augentropfen | A | | 170 | < 10 | < 10 | | < 10 | < 0,1% | 1T | 5,4 | 9.7 |
| 8 | Pilocarpin-HCl 1% | A | I | 120 | < 10 | < 10 | | < 10 | < 0,1% | 1T | 5,3 | |
| 9 | in $NaNO_3$-Lg 1% | A | +IV | 5500 | 20 | | | < 10 | < 0,1% | 3T | 5,4 | |
| 10 | Pilocarpin-NO 1% in $NaNO_3$-Lg 1% | A | " | < 10 | < 10 | | | < 10 | < 0,1% | 1T | 5,0 | 9.7 |
| 11 | Targesin 5% Augentr. DAC | A | I | < 10 | < 10 | | | < 10 | < 0,1% | 1T | 6,0 | 9.7 |
| 12 | Tetracain 1% | C | I+ | < 10 | | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% | 1T | 5,2 | 2.7 |
| 13+ | Augentr. DAC | C | IV | < 10 | | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | 5,2 | 5.7 |
| 13* | | C* | | < 10* | | < 10* | < 10* | < 10* | " | " | 5,2 | 5.7 |
| 14 | Tetracain 1% +Methylcellulose | C | I+ | < 10 | | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | 5,2 | 5.7 |
| 14* | Methocel 1500, 0,5% | C* | IV | < 10* | | < 10* | < 10* | < 10* | " | " | 5,3 | 5.7 |
| 15 | Natriumchlorid | C | I+ | < 10 | < 10 | | | < 10 | "" | " | 5,3 | 9.7 |
| 16 | Lösung 0,7% | A | IV | < 10 | < 10 | | | < 10 | " | " | 5,3 | 9.7 |
| | | | | Vergleichslösungen ohne Silber | | | | | | | | |
| V 1 | Atropin 1 % Augentr. DAC | | I | $25.10^6$ | | $36.10^4$ | $22.10^3$ | | 0,1% 1,5% | 2Wo 1Wo | 5,0 | |
| V 3 | Atropin 1% c.Methylcellulose Augentr. DAC | | I | $25.10^6$ | | $35.10^5$ | | | 10% | 2Wo | 5,5 | |
| V 4 | Aethylmorphin 2% Augentr.DAC | | I+ IV | 10 | 10 | | 10 | | 0,1% | 1T | 5,3 | |
| V 8 | Pilocarpin-HCl 1% in $NaNO_3$ 1% | | I+ IV | $7.10^5$ | $10^3$ | 10 | 10 | 10 | ~ 0,1% | 3T | 5,2 | |
| V10 | Pilocarpin-$NO_3$ 1% in $NaNO_3$ 1% | | I+ IV | $10^6$ | | $10^4$ | | Wachst. in IV | 1% | 1Wo | 5,2 | |
| V11 | Targesin 5% Augentr. DAC | | I+ IV | < 10 | | 10 | | 10 | < 0,1% | 1T | 6,0 | |
| V12 | Tetracain 1% Augentr. DAC | | I+ IV | < 10 | | 10 | | 10 | < 0,1% | 1T | 5,2 | |
| V15 | Natriumchlorid Lg 0,9% | | I | ~ $10^6$ | $39.10^5$ | $19.10^5$ | $3.10^3$ | | 20% | 1Wo | 5,8 | |
| V17 | Dest. Wasser | | I | $2.10^6$ | | $2.10^5$ | $10^3$ | | 10% | 1Wo | 5,5 | |
| V16* | Natriumchlorid Lg 0,9% | | I | ~ $10^6$* | | $9,7.10^4$* | $5.10^3$* | 84 * | 10% * | 1Wo | | |
| V18* | Borsäure-Lg 1,9% | | I | $17.10^3$* | | $6.10^3$* | — | 10 * | 0,6% * | 1Wo | | |

Tab 13

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

[4] *Testkeim:* Bac.subt.ATCC-BS 6633 *Keimeinsaat:* $7,7 \cdot 10^5$ / $1 \cdot 10^5$ K/ml (Nr Ser 2.77 / 12.77) 2 Serien-BS

[5] Bac.cereus ATCC-BC 9634 *überlebende Keime nach* $6 \cdot 10^5$ " " 1 Serie -BC

| Nr. al | | Prüflösung 20,0 | G | M | 1 Tag K/ml | 3 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3+4 Wo. K/ml | % Überleb. Keime nach | pH nach 4 Wo | Serie Nr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hilfsstoffe in isoton. Lg. Augentropf.-Formuller | 1 | Atropin 1% Augentr. DAC | C | BS | | | $1,3 \cdot 10^3$ | 750 | | ~0,5% 1Wo | 5,0 | 2.77 |
| | 2 | Atropin -1% DAC + Methylcellulose 0,5% | C | BS | | | 10 | 450 | | <0,1% 1Wo | 5,5 | 2.77 |
| | 3 | Pilocarpin-HCl 1% in NaCl-Lg 0,7% | A | BS | 600 | 620 | 500 | | 400 | 0,5% 1Wo | 5,4 | 12.77 |
| | 4 | Zinksulfat 0,25% Augentro. DAC | B | BC | < 10 | | < 10 | | < 10 | <0,1% 1T | 4,9 | 8.77 |
| | 5 | Tetracain 1% Augentr. DAC | C | BS | | | < 10 | < 10 | | <0,1% 1Wo | 5,0 | 2.77 |
| | 6 | isotonische Phosphat-Puffer-Lg | A | BS | 350 | 140 | 160 | | 170 | 0,16% 1wo | 6,8 | 12.77 |
| | 7 | pH 6,9 | A | | 350 | 150 | 170 | | 250 | 0,17% " | 6,8 | |
| | 8 | Natriumchlorid | A | BS | 1300 | 1000 | 780 | | 400 | 0,8% 1Wo | 5,7 | |
| | 9 | -Lösung 0,7% | A | | 1250 | 900 | 1000 | | 800 | 1% " | 5,7 | " |
| | 10 | Borsäurelösung | A | BS | 560 | 60 | 20 | | 25 | < 0,1% 1Wo | 4,7 | " |
| | 11 | 2% | A | | 700 | 120 | 100 | | 210 | 0,12% " | 4,7 | |
| | 12 | Natriumnitrat | A | BC | 100 | 100 | 50 | | | < 0,1% 1T | 6,5 | 8.77 |
| | 13 | Lösung 1,3% | A | BC | 100 | - | 80 | | 50 | " " | | |
| | | | Vergleichslösungen ohne Silber | | | | | | | | | |
| V | 1 | Atropin - 1% Augentropfen DAC | | BS | | | $55 \cdot 10^3$ | $1,1 \cdot 10^3$ | | 0,8% 1Wo<br>0,2% 2wo | 5,0 | |
| V | 2 | Atropin - 1% DAC + Methylcelluse 0,5% | | BS | | | $3 \cdot 10^3$ | $1 \cdot 10^2$ | | 0,5% 1Wo | 5,5 | |
| V | 5 | Tetracain 1% Augentropfen DAC | | BS | | | 210 | 60 | | < 0,1% 1Wo | 5,0 | |
| V | 6 | isotonische Phosphat-PufferLg pH 6,9 | | BS | | | 900 | | 300 | 1% 1Wo | 6,9 | |
| V | 8 | Natriumchlorid-Lg 0,7% | | BS | | | 1700 | | 800 | 1,7% " | 5,6 | |
| V | 10 | Borsäure-Lg 2% | | BS | | | 2000 | | 520 | 2% " | 4,7 | |
| V | 12 | Natriumnitrat-LG 1,3% | | BC | $2,5 \cdot 10^5$ | | 40<br>100 | | 100 | < 0,1% "<br>< 0,1% | 6,5 | |

Nährmedien: (M) + 0,25% Na.-Thioglycolat

Gefäße: (G)

I CASO-Agar
II Mac CONKEY-Agar
III Sab.- Maltose-Agar
IV CSB-Bouillon
V Sab.-Maltose-Bouillon

A Silberchlorid-Ring (Zentrop-Flasche)
B Silbercholrid-Fritte
C versilberte Pipette (Stella-Flasche)

Tab.: 14

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

6 *Testkeim:* Cand.alb. ATCC 10231 *Keimeinsaat:* $1{,}5 \cdot 10^5$ K/ml 4 Serien; $3 \cdot 10^5$ " " 1 Serie (5.77)

* Cand.alb.Kruse: $10^4$ K/ml

überlebende Keime nach

| Nr. ml | Prüflösung 20,0 | G | M | 1 Tag K/ml | 3 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3+4 Wo. K/ml | % überleb. Keime | nach | pH nach 4 Wo | Serie Nr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Augentropfen - Formulierungen | | | | | | | | | | | | |
| 1 | Atropin 1% | A | III IV | 200 | | 30 | | < 10 | < 0,1% | 1 T | 5,0 | 5.77 |
| *2 | Augentr. DAC | A* | " | <10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1%* | 1 T | 4,8 | |
| 3 | thylmorphin 2% Augentr. DAC | A | " | | 40 | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% | 3 T | 5,3 | 9.77 |
| 4 | Pilocarpin-$NO_3$ 1% | A | " | | $3{,}5 \cdot 10^3$ | 240 | 100 | < 10 | 0,2% | 1Wo | 5,0 | 9.77 |
| 5 | im $NaNO_3$-Lg 1% | A | " | | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% | 3 T | 5,2 | |
| 6 | Pilocarpin-$NO_3$ 1% + PVA 1% in $NaNO_3$-Lg | A | " | 800 | | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% | 1Wo | 5,5 | 9.77 |
| 7 | Pilocarpin-HCl 1% + PVA 1% inisot.NaCl-Lg | A | " | $6{,}6 \cdot 10^3$ | | $1{,}3 \cdot 10^3$ | 160 | $3{,}5 \cdot 10^3$ | 2% | 4Wo | 5,5 | 9.77 |
| 8 | Pilocarpin-HCl 1% +Methocel E4M 0,1% | A | " | $10^4$ | | 70 | < 10 | < 10 | < 0,1% | 1Wo | 5,0 | 9.77 |
| 9 | in $H_3BO_3$-Lg isot. | C | " | $1{,}2 \cdot 10^3$ | | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | | |
| 10 | Tetracain 1% | C | " | < 10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% | 1T | 5,3 | 5.77 |
| *11 | Augentr. DAC | C* | " | < 10 | | < 10 | | < 10 | " * | " | | |
| 12 | Tetracain 1% | C | " | 670 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% | 1Wo | 5,3 | 5.77 |
| *13 | +Methocel 1500 0,5% Augentr.DAC | C* | " | 10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% * | 1 T | 5,3 | |
| 14 | Zinksulfat 0,25% Augentr. DAC | A | " | | 860 | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% | 1Wo | 4,9 | 8.77 |
| Hilfsstoffe f. Augentropfen | | | | | | | | | | | | |
| 15 | Natriumchlorid | A | " | | $10^3$ | 550 | 25 | < 10 | < 0,1% | 3 T | 5,4 | |
| 16 | Lösung 0,7% | A | " | | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | 5,6 | 10.7 |
| 17 | | C | " | | 130 | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | 5,4 | |
| 18 | Natriumnitrat | A | " | | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% | 3 T | 5,7 | 10.7 |
| 19 | Lösung 1,3% | A | " | | " | " | " | " | " | " | 5,7 | |
| 20 | isotonische Phosphat | A | " | | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% | 3 T | 6,9 | 10.7 |
| 21 | PufferLg. +NaCl:Nr. 21 | A | " | $3 \cdot 10^5$ | | $3 \cdot 10^5$ | $3 \cdot 10^5$ | $10^5$ | 100% | 2Wo | 7,2 | 8.77 |
| 22 | PVA 1% in $H_2O$ | C | " | < 10 | | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% | 1 T | 5,4 | 10.7 |
| 23 | PVA 1% in NaCl 0,7% | A | " | | | $3{,}5 \cdot 10^3$ | | 100 | 2% | 1Wo | 6,4 | " |
| 24 | Methocel MC 1500 0,5% in NaCl-Lg 0,7% | C | " | $3{,}4 \cdot 10^4$ | $3{,}4 \cdot 10^3$ | < 10 | < 10 | < 10 | < 0,1% | 1Wo | 5,6 | " |

Tab.15 Nährmedien: (M) + 0,25% Na.-Thioglycolat

I CASO-Agar
II Mac CONKEY-Agar
III Sabb. Maltose-Agar
IV CSB-Bouillon
V Sabb.Maltose-Bouillon

Gefäße: (G)

A Silberchlorid-Ring Zentrop-Flasche
B Silbercholrid-Fritte
C versilberte Pipette Stella-Flasche
D $AgNO_3$ - Lösung

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

6 *Testkeim:* Cand. alb. ATCC 10231 *Keimeinsaat:* $1{,}5 \cdot 10^5$ / $3 \cdot 10^5$ *K/ml* 4 Versuchsserien

* Cand. alb. Kruse: $10^4$ K/ml *überlebende Keime nach*

| Nr. al | Prüflösung 20,0 | G | M | 1 Tag K/ml | 3 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3+4 Wo. K/ml | % überleb. Keime | nach |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vergleichslösungen ohne Silber | | | | | | | | | |
| $V_6$ | Pilocarpin $NO_3$ 1% | - | III | $2{,}7.10^4$ | | $2.10^4$ | $3.10^3$ | $8.10^3$ | 2% | 14 T |
| | $NaNO_3$ 1% PVA 1% | | | | | | | | 5% | 4 Wo |
| $V_8$ | Pilocarpin HCl 1% $H_3BO_3$ 1,5% | - | " | $3.10^4$ | | $10^3$ | < 10 | < 10 | < 1% | 1 Wo |
| | Methocel E4M 0,5% | | | | | | | | < 0,1% | 2 Wo |
| $V_{23}$ | PVA 1% in NaCl 0,7% | - | " | | $1{,}3.10^5$ | $1{,}1.10^5$ | | $13.10^4$ | 10% | 4 Wo |
| $V_{24}$ | Methocel $E_4M$ 0,5% in Wasser | - | " | $7{,}2.10^4$ | | $6{,}8.10^4$ | $10^4$ | $10^4$ | ~ 10% | 4 Wo |
| $V_{15}$ | NaCl-Lösung 0,7% | - | " | $1{,}6.10^5$ | $1{,}2.10^5$ | $9.10^4$ | | $10^4$ | ~ 10% | 4 Wo |
| $V_{14}$ | $ZnSO_4$ 0,25% Augentropfen DAC ohne K.M. | - | " | $2{,}0.10^5$ | $5.10^4$ | $6.10^3$ | | < 10 | 4% | 1 Wo |
| $V_7$ | Pilocarpin HCl 1% NaCl 0,4% PVA 1,5% | - | " | | | 100 | < 10 | | < 0,1% | 1 Wo |
| $V_4$ | Pilocarpin-$NO_3$ 1% $NaNO_3$ 1% | - | " | | $2.10^5$ | $1{,}3.10^5$ | $10^5$ | | ~ 10% | 2 Wo |
| $V_3$ | Aethylmorphim 1% Augentr. DAC ohne K.M. | - | " | | $10^4$ | $36.10^3$ | $2.10^3$ | | > 1% | " |
| $V_{25}$ | Borsäure-Lg 1,9% | - | " | 150 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% | 1 T |
| *$V_{26}$ | | | " | < 10 | | < 10 | | < 10 | < 0,1% * | " |
| $V_{16}$ | NaCl-Lösung | - | " | | | $8.10^4$ | $6{,}6.10^4$ | $10^4$ | 3%/20% | 4Wo/2Wo |
| *$V_{17}$ | | | " | | | $3.10^3$ | $5{,}3.10^3$ | $2{,}7.10^3$ | 30%/50% * | 4Wo/2Wo |

Tab. 16

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

2 Serien

7 *Testkeim:* Aspergillus oryzae

*Keimeinsaat:* $2.10^4$ K/ml Nr. 9.77
$6.10^3$ Nr. 5.77

*überlebende Keime nach*

Hilfslösungen = Augentropfenformulierungen

| Nr. ml | Prüflösung 20° | G | M | 1 Tag K/ml | 3 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3-4 Wo. K/ml | % überleb. Keime | nach | pH nach 4 Wo. | Serie Nr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Atropin 1% DAC Augentropfen | A | III-+ V | 870 | | 20 | < 10 | < 10 | < 1% | 1Wo | 5,2 | 5,7 |
| 2 | Tetracain 1% DAC Augentropfen | C | III | <10 | | <10 | < 10 | < 10 | < 0,1% | " | 5,5 | 5.77 |
| 3 | Tetracain 1% DAC + 0,5% Methyl-cellulose | C | + V | <10 | | <10 | < 10 | < 10 | " | " | | |
| 4 | Zinksulfat 0,25% | A | III | | <100 | < 10 | < 10 | < 10 | <0,1% | 1Wo | 4,9 | 9.77 |
| 5 | Augentr. DAC | | +V | | <100 | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | | |
| 6 | Phosphat-NaCl Pufferlösung isot. PH 7,0 | A | III | $2.10^3$ | | $1,5.10^3$ | | $3,5.10^3$ | 55% | 4Wo | 7,0 | 5.77 |
| 7 | Natriumnitrat-Lg 1,3% | A | | | 450 | | 160 | 60 | < 1% | 2Wo | 5,5 | 9.77 |
| 8 | dest. Wasser | A | | | $4,4.10^3$ | | $3.10^3$ | $2.10^3$ | 10% | 4Wo | 5,5 | 9.77 |
| | | | | Vergleichslösungen ohne Silber | | | | | | | | |
| V9 | Borsäure Lösung 1,9% | | III | $2.10^3$ | | 425 | 300 | 10 | 5% | 2Wo | 4,6 | 5.77 |
| V4 | Zinksulfat 0,25% Augentr. DAC | | III + V | | 100 | 10 | 10 | 10 | <0,1% | 1Wo | 4,9 | 9.77 |
| V7 | Natriumnitrat-Lg 1,3% | | III + V | | $10^3$ | | $1,5.10^3$ | 610 | 10% | 2Wo | 5,5 | 9.77 |
| V10 | Natriumchlorid-Lg 0,9% | | III | | | $6.10^3$ | | $15.10^3$ | 100% 25% | 1Wo 4Wo | 5,8 | 5.77 |

Tab. 17

Entkeimung der Prüflösung:

durch Sterilfiltration oder Dampfsterilisation, aseptisch in sterilisierte Gefäße abgefüllt.

Lagerung:

bei Raumtemperatur (15-25°C) liegend, Ser. 9.77 Flaschen 3-tgl. auf den Kopf gestellt, Ser. 5.77

Inoculation:

2 Tage nach Abfüllen der Prüflösung, 0,2/20,o Keimsuspension in NaCl-Lösung

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

*Testkeim:* E.Coli ATCC 8735, Pseud.aer.ATCC 9027, Staph.aur.ATCC 6538, Enterobacter *Keimeinsaat:* $1{,}7 \cdot 10^6$ K/ml — 3 Versuchsserien 8.77 10.77

Mischsuspension — *überlebende Keime nach*

| Nr. | Prüflösung 20,0 | G | M | 1 Tag K/ml | 3 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3+4 Wo. K/ml | % überleb. Keime nach: | | pH nach 4Wo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Pilocarpin-HCl 1% NaCl-0,7% Augentropf. DAC | C | I | $10^4$ | | < 10 | < 10 | < 5 | < 0,1% | 1Wo | 5,3 |
| 2 | " | A | I | $2 \cdot 10^4$ | andere K.als TestK. | $8 \cdot 10^6$ | konta-minierte Lg | 100 | | | 5,2 |
| 3 | Pilocarpin-$NO_3$ 1% in $NaNO_3$-Lg | C | I | 10 | | < 10 | < 10 | < 5 | < 0,1% | 1T | 4,5 |
| 3 a | " | A | I | 90 | nur Staph. aur. | 150 | | 600 | " | " | 4,8 |
| 4 | " | A | I | < 10 | | < 10 | | < 5 | " | " | 5,0 |
| 5 | " +PVA 1% | A | I | $26 \cdot 10^3$ | 10 | < 10 | < 10 | < 10 | " | 3T | 5,4 |
| 6 | " +PVA 1% | A | I | 10 | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | " | 1T | 5,4 |
| 7 | Pilocarpin-HCl 1% Borsäure 1,5% Methocel E4M 0,1% | C | I | 20 | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | 5,0 |
| 8 | " | A | I | 310 | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | 4,9 |
| 9 | " | C | I | 10 | 650 | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | 5,0 |
| 10 | " | A | I | 20 | 10 | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | 4,9 |
| 11 | Pilocarpin-HCl 1% NaCl 0,4% PVA 1,5% | A | I | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | 5,5 |
| 12 | " | A | I | 500 | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | " | " | 5,4 |
| 21 | $ZnSO_4$ 0,25% Au.Tr. DAC ohne K.-M. | C | I | < 10 | < 10 | < 10 | | < 10 | " | " | 4,8 |
| 22 | " | A | I | < 10 | < 10 | < 10 | | < 10 | " | " | 4,7 |
| 13 | Methocel $E_4M$ 0,1% in Wasser | A | I | $8 \cdot 10^3$ | $10^5$ | $10^5$ | $10^5$ | $\sim 10^6$ | ~ 100% Pseud aer | 4Wo | 5,7 |
| 14 | " | A | I | $10^5$ | $10^5$ | $10^5$ | $10^5$ | $\sim 10^6$ | ~ 100% Pseud aer | 4Wo | 5,0 |
| 15 | PVA 1% in NaCl 0,7% | C | I | 450 | < 10 | < 10 | | < 5 | < 0,1% | 1T | 5,8 |
| 16 | " " | C | I | $10^4$ | Pseud aer allein | $10^3$ | 330 | < 10 | ~0,1% < 0,1% | 1Wo 2Wo | 5,9 |
| 17 | " " | A | I | $5 \cdot 10^4$ | " | $10^5$ | $5 \cdot 10^5$ | $6 \cdot 10^5$ | >100% meist Pseud. | 4Wo | 5,9 |
| 18 | Oc.- Viscosae DAC Methyl-Cellulose in NaCl | A | I | $10^6$ | Pseud.aer +E.coli | $10^6$ | $10^6$ | $6 \cdot 10^5$ | > 100% | 4Wo | 5,7 |
| 19 | " | C | I | $10^4$ | – | < 10 | < 10 | < 5 | < 0,1% | 1Wo | 6,0 |

Augentropfen - rorrflerungen

Hilfsstoffl.osungen

kein Pseud. aer

Tab. 18

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

*Testkeim:* E.coli ATCC 8735; Pseud.aer." 9027; Staph.aur." 6538; Enterobact. — *Keimeinsaat:* $1{,}7.10^6$ *K/ml* — 3 Versuchsserien

Mischsuspension — *überlebende Keime nach*

| Nr. ml | Prüflösung 20,0 | G | M | 1 Tag K/ml | 3 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3-4 Wo. K/ml | % Überleb. Keime nach | 4 Wo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Vergleichslösungen ohne Silber | | | | | | |
| W1 | Pilocarpin HCl 1% Au.Tr.DAC ohne KM | - | I | $2{,}7.10^6$ | $1{,}7.10^6$ | - | $10^6$ | $\sim 10^6$ | ~ 100% | 4Wo |
| V3-4 | Pilocarpin $NO_3$ 1% in $NaNO_3$ 1% | - | I | $25.10^6$ | $2.10^5$ | $3.10^5$ | | $3{,}5.10^5$ | 20% | 4Wo |
| V5-6 | " +PVA 1% | - | I | $18.10^6$ | $17.10^6$ | meist Pseud. | $10^6$ | - | ~100% | 2Wo |
| W7-8 | Pilocarpin HCl 1% $H_3BO_3$ 1,5% Methocel E4M 0,1% | - | I | $4.10^6$ | $6.10^4$ | < 10 | <10 | - | < 0,1% | 1Wo |
| V11-12 | Pilocarpin HCl 1% NaCl 0,4 % PVA 1,5% | - | I | $10^3$ | 500 | 100 | - | - | < 0,1% | " |
| V13-14 | Methocel E4M 0,1% in Wasser | - | I | - | $> 10^6$ K | - | $10^6$ | $10^6$ | 100% | 4wo |
| W15-17 | PVA 1% in NaCl 0,7% | - | I | $9.10^5$ | - | $6.10^6$ | $10^7$ | $10^6$ | ~ 100% | 4Wo |
| V15-17 | PVA 1% in NaCl 0,7% | - | I | | $1{,}5.10^6$ | $2.10^6$ | $3.10^6$ | $2.10^6$ | ~ 100% | 4Wo |
| V20 | $NaNO_3$-Lg 1% | - | I | $1{,}6.10^6$ | - | $2.10^6$ | $2.10^6$ | $6.10^6$ | 300% | 4Wo |
| V21-22 | $ZnSO_4$ 0,25% Au.Tr.DAC ohne K.M. | - | I | $4{,}5.10^3$ | 15 | < 10 | - | < 10 | < 0,1% | 3T. |

Tab.19

Nährmedien: (M) + 0,25% Na.-Thioglycolat

I CASO-Agar
II Mac CONKEY-Agar
III Sab.- Maltose-Agar
IV CSB-Bouillon
V Sab.-Maltose-Bouillon

Gefäße: (G)

A Silberchlorid-Ring (Zentrop-Flasche)
B Silbercholrid-Fritte
C versilberte Pipette (Stella-Flasche)
D $AgNO_3$ - Lösung

Keine ATCC - Stämme!

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

Testkeime [1] E.Coli 4 Stämme
Pseud.aer. 4 "
Staph.aur. 4 "

Mischsuspension

**Keimeinsaat:**

E.coli: $2{,}4 \cdot 10^6$ K/ml
Pseud.aer: $8{,}6 \cdot 10^5$ K/ml
Staph.aur: $4 \cdot 10^5$ K/ml

## überlebende Keime nach

| Nr. ml | Prüflösung 20,0 | G | M | Keimart | 1 Tag K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3+4 Wo. K/ml | % Überleb. Keime nach | pH-Wert nach 4 Wo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Pilocarpin HCl 1% NaCl 0,7% Augentropfen DAC ohne K.-M. | C | II | Coli | $5 \cdot 10^4$ | <10 | < 10 | < 10 | < 0,1% 1 Wo. | |
| | | C | I | Pseud | $5 \cdot 10^4$ | <10 | < 10 | < 10 | " " | 5,8 |
| | | C | I | Staph | $5 \cdot 10^4$ | <10 | < 10 | < 10 | " " | |
| 2 | Pilocarpin-$NO_3$ 1% in $NaNO_3$-Lg 1% | C | II | Coli | 520 | <10 | < 10 | < 10 | " " | |
| | | C | I | Pseud. | < 10 | <10 | < 10 | < 10 | " " | 5,0 |
| | | C | I | Staph. | $9 \cdot 10^3$ | <10 | < 10 | < 10 | " " | |
| 3 | Pilocarpin HCl 1% NaCl 0,7% Augentropfen DAC ohne K.-M. | A | II | Coli | $5 \cdot 10^4$ | <10 | < 10 | < 10 | " " | |
| | | A | I | Pseud. | $2 \cdot 10^3$ | <10 | < 10 | < 10 | " " | 5,8 |
| | | A | I | Staph. | $10^4$ | <10 | < 10 | < 10 | " " | |
| 4 | Pilocarpin-$NO_3$ 1% $NaNO_3$-Lg 1% | A | II | Coli | < 10 | <10 | < 10 | < 10 | " " | |
| | | A | I | Pseud. | < 10 | <10 | < 10 | < 10 | " " | 4,9 |
| | | A | I | Staph. | 80 | <10 | < 10 | < 10 | " " | |
| 5 | Methocel MC 1500 0,5% in NaCl 0,7% Ocul.Viscosae DAC ohne K.-M. | C | II | Coli | $10^5$ | <10 | < $10^5$ | < $10^5$ | " " | |
| | | C | I | Pseud. | $10^4$ | $10^5$ | $1{,}8 \cdot 10^5$ | $10^5$ | >10% 4Wo. | 6,0 |
| | | C | I | Staph. | $10^5$ | <10 | < 10 | < 10 | < 0,1% 1Wo | |
| 6 | Methocel MC 1500 0,5% in NaCl 0,7% Ocul.Viscosae DAC ohne K.-M. | A | II | Coli | $4 \cdot 10^3$ | $10^5$ | $10^4$ | $3{,}4 \cdot 10^4$ | 5% 4Wo. | |
| | | A | I | Pseud. | $2 \cdot 10^4$ | $10^6$ | $10^6$ | $10^5$ | >10% 4Wo. | 6,0 |
| | | A | I | Staph. | $10^5$ | <10 | < 10 | < 10 | < 0,1% 1Wo. | |
| 7 | PVA 1% Polyvinylalkohol in NaCl 0,7% | C | II | Coli | $10^5$ | < 10 | < $10^3$ | < 10 | < 0,1% 1Wo. | |
| | | C | I | Pseud. | $10^5$ | < 10 | < 10 | < 10 | ~ 0,2% 2Wo. | 6,0 |
| | | C | I | Staph. | $10^5$ | <10 | < 10 | < 10 | < 0,1% 1Wo. | |
| 8 | PVA 1% Polyvinylalkohol in NaCl 0,7% | A | II | Coli | $10^4$ | $10^3$ | < 10 | < 10 | < 0,1% 1Wo. | |
| | | A | I | Pseud. | $6 \cdot 10^5$ | <10 | < 10 | < 10 | < 0,1% 1Wo. | 6,0 |
| | | A | I | Staph. | $10^5$ | <10 | < 10 | < 10 | " " | |

Tab.: 20

[1]

| Stämme Nr.: | |
|---|---|
| E.coli: | 51171, 0206, 0273 Dispepsi |
| Pseud. aer.: | 1450, 4569, 3594, 0363 |
| Staph.aur.: | SG 511, 0124, 4, 5 |

Vergleichslösungen ohne Silber

Keine ATCC-Stämme

Testkeime: Mischsuspension [1] (s Tab. 20)

E.coli: 4 Stämme
Pseud.aer.: 4 Stämme
Staph.aur.: "

E.coli: $2{,}4.10^6$ K/ml
Pseud.aer.: $8{,}6.10^5$ K/ml
Staph. aur.: $4.10^5$ K/ml

## überlebende Keime nach

| Nr. ml | Prüflösung 2o,o | G | M | Keimart | 1 Tag K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3-4 Wo. K/ml | % überleb. Keime nach | pH-Wert nach 4 Wo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| V1 | Vergleichs-Lg Pilocarpin-HCl 1% in NaCl 0,7% | | I | Pseud. | $6.10^5$ | $5.10^5$ | $5.10^5$ | | 70% 4Wo. | 5,8 |
| V2 | Vergleichs-Lg Pilocarpin-$NO_3$% in $NaNO_3$ - Lg 1% | | II | Coli. | $2.10^5$ | $1{,}6.10^5$ | $1{,}4.10^5$ | $1{,}4.10^5$ | ~ 10% 4Wo. | |
| | | | I | Staph. | $1{,}8.10^6$ | $10^3$ | 50 | $< 10^3$ | ~ 1% 4Wo. | |
| V | Vergleichs -Lg $NaNO_3$- Lg 1,3% | | I | Pseud. | $2.10^6$ | $4.10^6$ | $2.10^6$ | | >100% 2Wo. | 6,4 |
| | | | I | Staph. | $10^6$ | $1{,}5.10^3$ | < 10 | < 10 | ~ 0,5% 1Wo. | |
| V5-6 | Methocel MH 1500 0,5% in dest. $H_2O$ Vergleichs -Lg | | II | Coli | $1{,}7.10^5$ | $6.10^6$ | $10^6$ | $5.10^5$ | > 10% 4Wo. | |
| | | | I | Staph. | $9.10^5$ | 100 | < 10 | < 10 | < 0,1% 1Wo. | 6,2 |
| V7-8 | PVA 1% in dest. $H_2O$ Vergleichs-Lg | | I | Pseud. | $48.10^6$ | $5.10^7$ | $10^8$ | $10^8$ | >100% 4Wo. | 6,2 |
| Vph | Phosphat-NaCl Puffer-Lg | | I | Staph. | | | $10^5$ | | 10% 2Wo. | 7,2 |

Stämme-Nr.: [1]
E.coli: 51171, 0206, 0273, Dispepsi
Pseud.aer.: 1450, 4569, 3594, 0363
Staph.aur.: SG 511, 0124, 4, 5

Tab.: 21

Nährmedien: (M) + 0,25% Na.-Thioglycolat

I CASO-Agar
II Mac CONKEY-Agar
III Sab.- Maltose-Agar
IV CSB-Bouillon
V Sab. Maltose-Bouillon

Gefäße: (G)

A Silberchlorid-Ring Zentrop-Flasche
B Silbercholrid-Fritte
C versilberte Pipette Stella-Flasche
D $AgNO_3$ - Lösung

Keine ATCC-Stämme!

# MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

*Testkeim:* Cand.Alb. 3 Stämme* *Keimeinsaat:* $1{,}4.10^5$ K/ml Serie:8.77

A. als Mischsusp. *überlebende Keime nach*

| Nr. | Prüflösung 20,0 | G | M | 1 Tag K/ml | 3 Tage K/ml | 1 Woche K/ml | 2 Wochen K/ml | 3+4 Wo. K/ml | % überleb. Keime nach | pH nach 4 Wo. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | PVA-Lg 1% | A | III + V | | $10^6$ | $5.10^5$ | $15.10^4$ | $2.10^4$ | 10% 4Wo | 6,2 |
| 2 | $ZnSo_4$-Augentr. DAC ohne K.M. | A | " | | 750 | 30 | < 10 | < 10 | <0,1% 1Wo | 5,0 |
| 3 | $NaNO_3$-Lg 1,3% | A | " | | <10 | < 10 | < 10 | < 10 | <0,1% 3T | 5,6 |
| | | | | * Vergleichslösungen ohne Ag | | | | | | |
| | PVA-Lg 1% in NaCl-Lg 0,7% | $V_1$ | III | | $6.10^5$ | $5.10^5$ | | $5.10^5$ | >100% 4Wo | 6,0 |
| | $NaNO_3$-Lg 1,3% | $V_3$ | | | | $24.10^3$ | | $2.10^3$ | > 1% 4Wo | 5,5 |

B. Cand.alb. Marburg 1 Stamm — $AgNo_3$-Lösungen — $10^4$ K/ml — Serie: 5.76

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 75 µg $Ag^+$/l | D | III | | | < 10 | | < 10 | < 0,1% 1Wo | |
| 5 | " | D | " | | | < 10 | | < 10 | " " | |
| 6 | " | D | " | | | < 10 | | < 10 | " " | |
| 7 | " | D | " | | | < 10 | | < 10 | " " | |
| 8 | " | D | " | | | < 120 | | < 10 | " " | |
| 9 | 30 µg $Ag^+$/l | D | " | | | < 130 | | < 10 | " " | |
| 10 | 30 " " | D | " | | | < 800 | | < 10 | " " | |
| | Vergleichs-Lg in $H_2O$ | V $H_2O$ | " | | | $26.10^4$ | | | >100% " | |
| | Phenyl-Hg-nitrat Lg 0,002% in $H_2O$ | $V_p$ | " | < 10 | | < 10 | | | < 0,1% 1T | |

*Stämme A: Cand. tropicans, Cand. Kruse, Cand. Marburg

Keimsuspension in NaCl-Lg 0,1/20,0

Tab. 22 Nährmedien: (M) + 0,25% Na.-Thioglycolat

I CASO-Agar
II Mac CONKEY-Agar
III Sab. - Maltose-Agar
IV CSB-Bouillon
V Sab.-Maltose-Bouillon

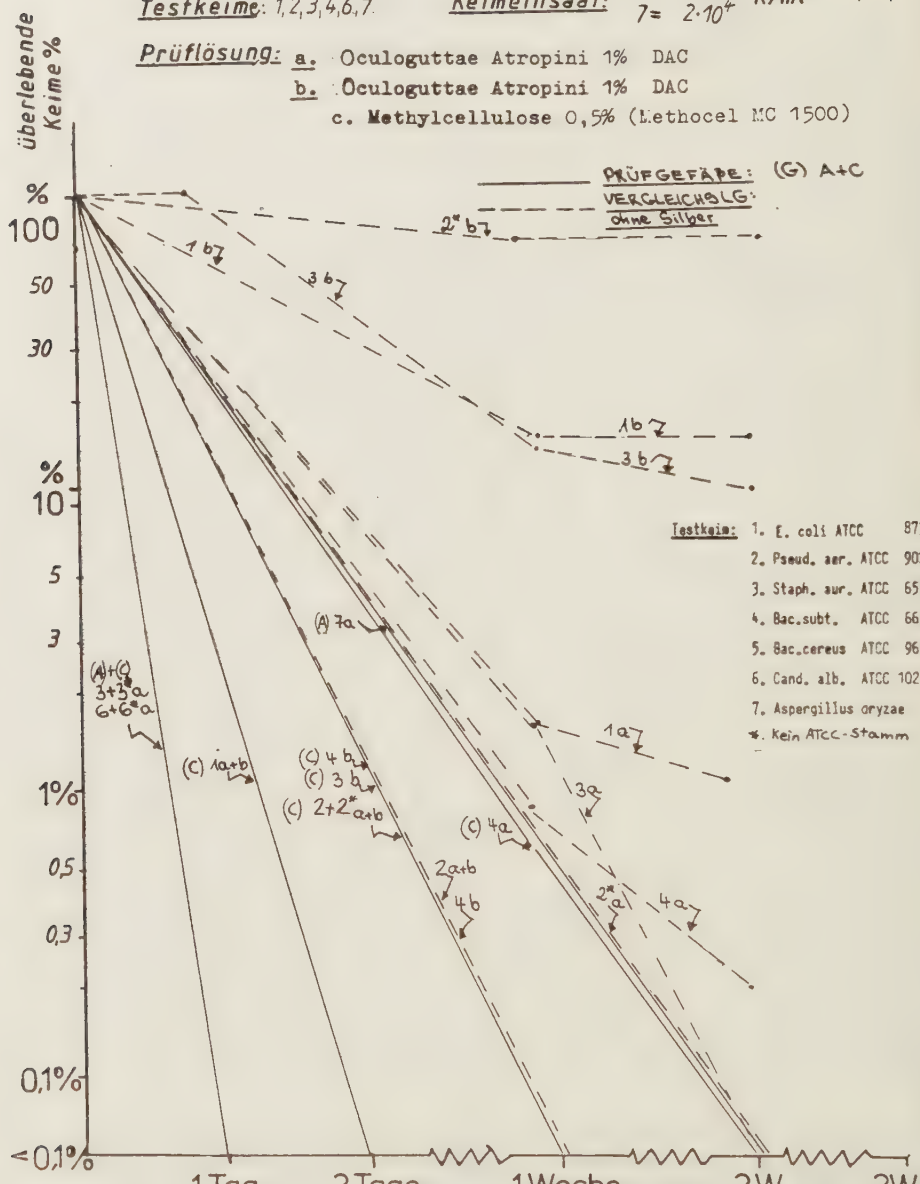
Gefäße: (G)

A Silberchlorid-Ring (Zentrop-Flasche)
B Silbercholrid-Fritte
C versilberte Pipette (Stella-Flasche)
D $AgNO_3$ - Lösung

## MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

**Testkeime:** 1,2,3,4,6,7 **Keimeinsaat:** 1-6 $\sim 10^6$ K/ml; 7= $2 \cdot 10^4$

**Prüflösung:** a. Oculoguttae Atropini 1% DAC
b. Oculoguttae Atropini 1% DAC
c. Methylcellulose 0,5% (Methocel MC 1500)




**Testkeim:**
1. E. coli ATCC 8739
2. Pseud. aer. ATCC 9027
3. Staph. aur. ATCC 6538
4. Bac. subt. ATCC 6633
5. Bac. cereus ATCC 9634
6. Cand. alb. ATCC 10231
7. Aspergillus oryzae
*. Kein ATCC-Stamm

Abb.: 19

## MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

**Testkeim:** Nr. 1-6 **Keimeinsaat:** ~ $10^6$ K/ml

**Prüflösung:**

a. Pilocarpin-HCl 1% in isotonischer NaCl-Lösung
b. Pilocarpin-HCl 1% in isotonischer $NaNO_3$-Lösung
c. Pilocarpin-$NO_3$ 1% in isotonischer $NaNO_3$-Lösung
d. Pilocarpin-HCl 1% in isotonischer $H_3BO_3$-Lösung
e. 0,5% Methylcellulose (Methocel MC 1500)
[a., b., c., + Polyvinylalkohol (PVA) 1%

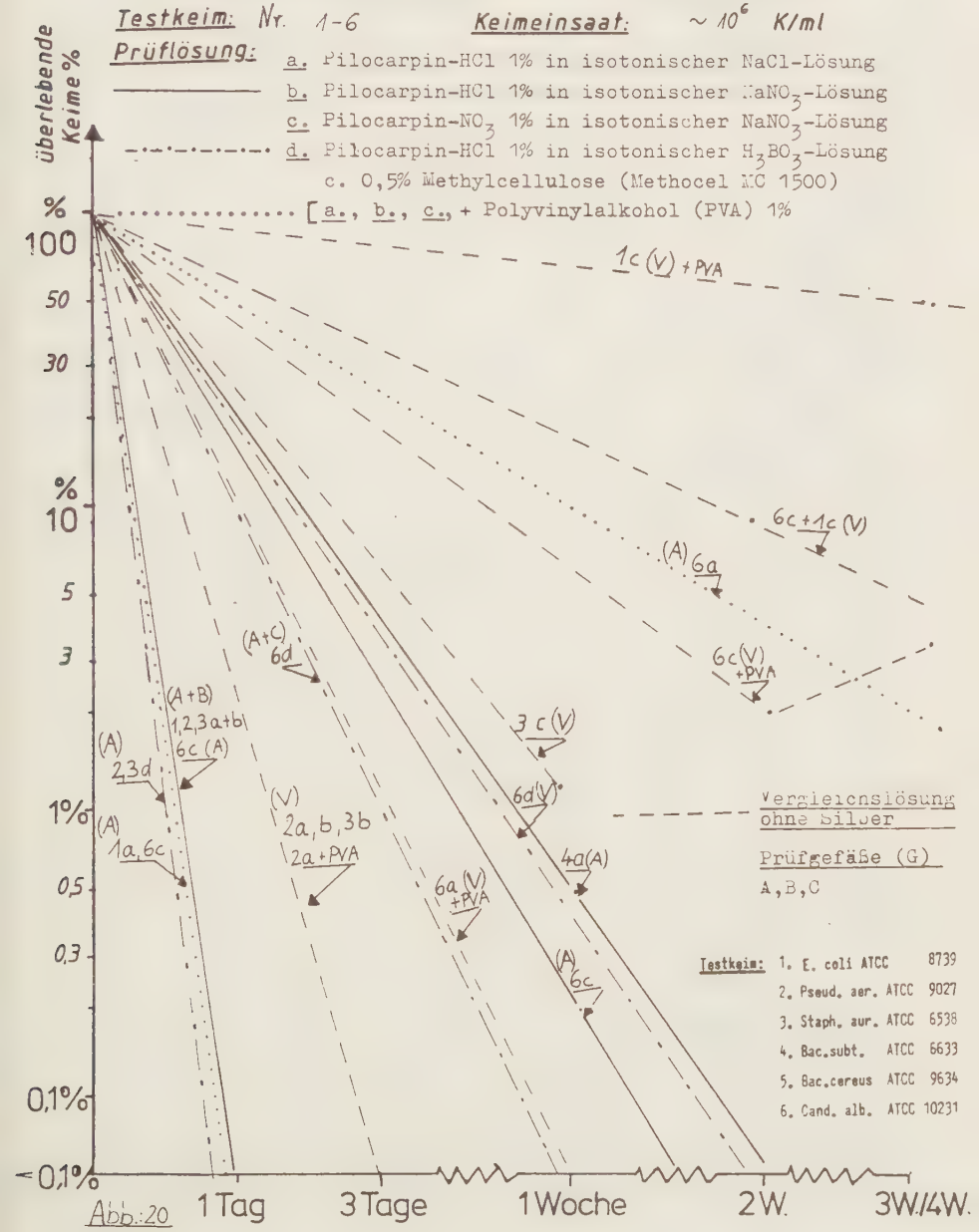



Abb. 20

## MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

**Testkeim:** 1-7 **Keimeinsaat:** $1-6 \sim 10^6$ K/ml $7 = 2 \cdot 10^4$

**Prüflösung:** Augentropfen des DAC ( lt. Vorschrift DAC)

a) Tetracain-HCl 1 %
b) Tetracain-HCl 1 %
c. Methylcellulose
c) Zinksulfat 0,25 %
d) Ethylmorphin 2 %
e) Targesin 5 %

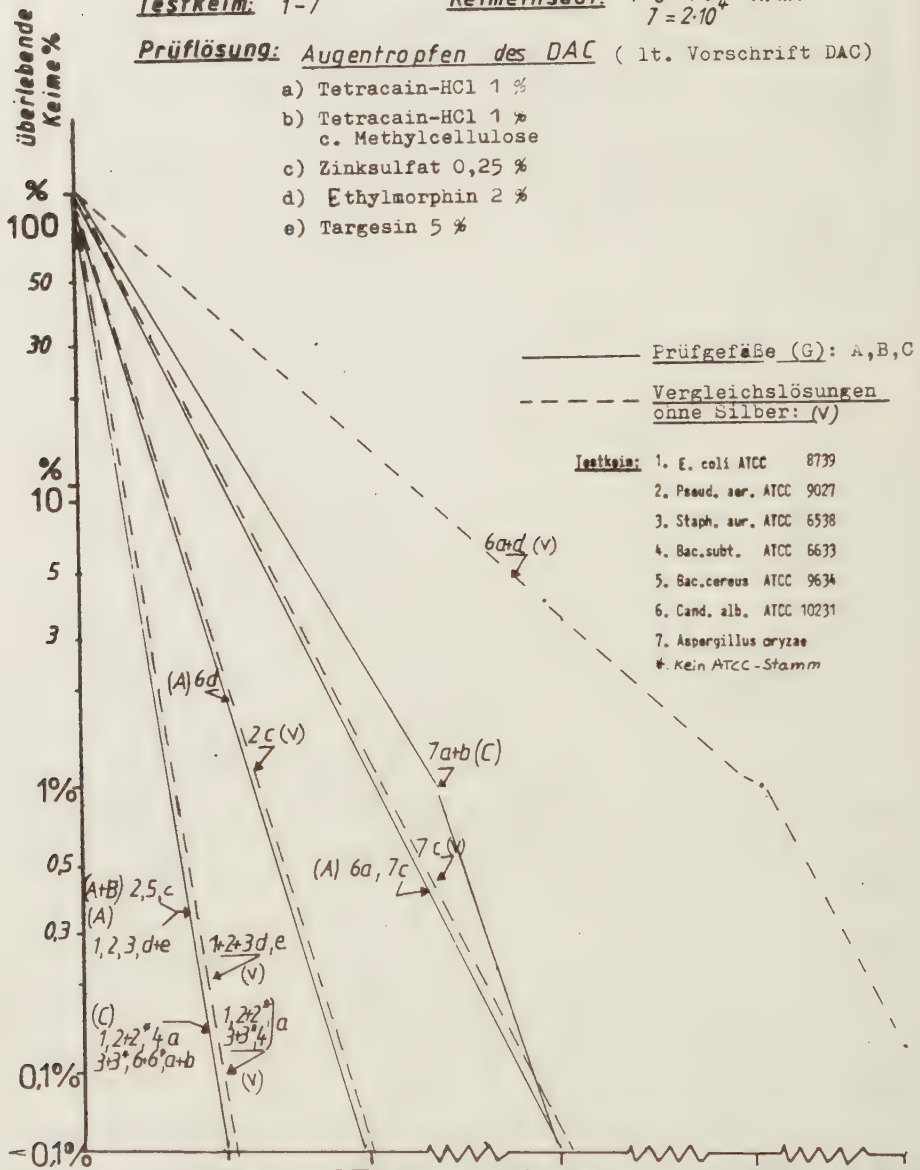



Abb.: 21

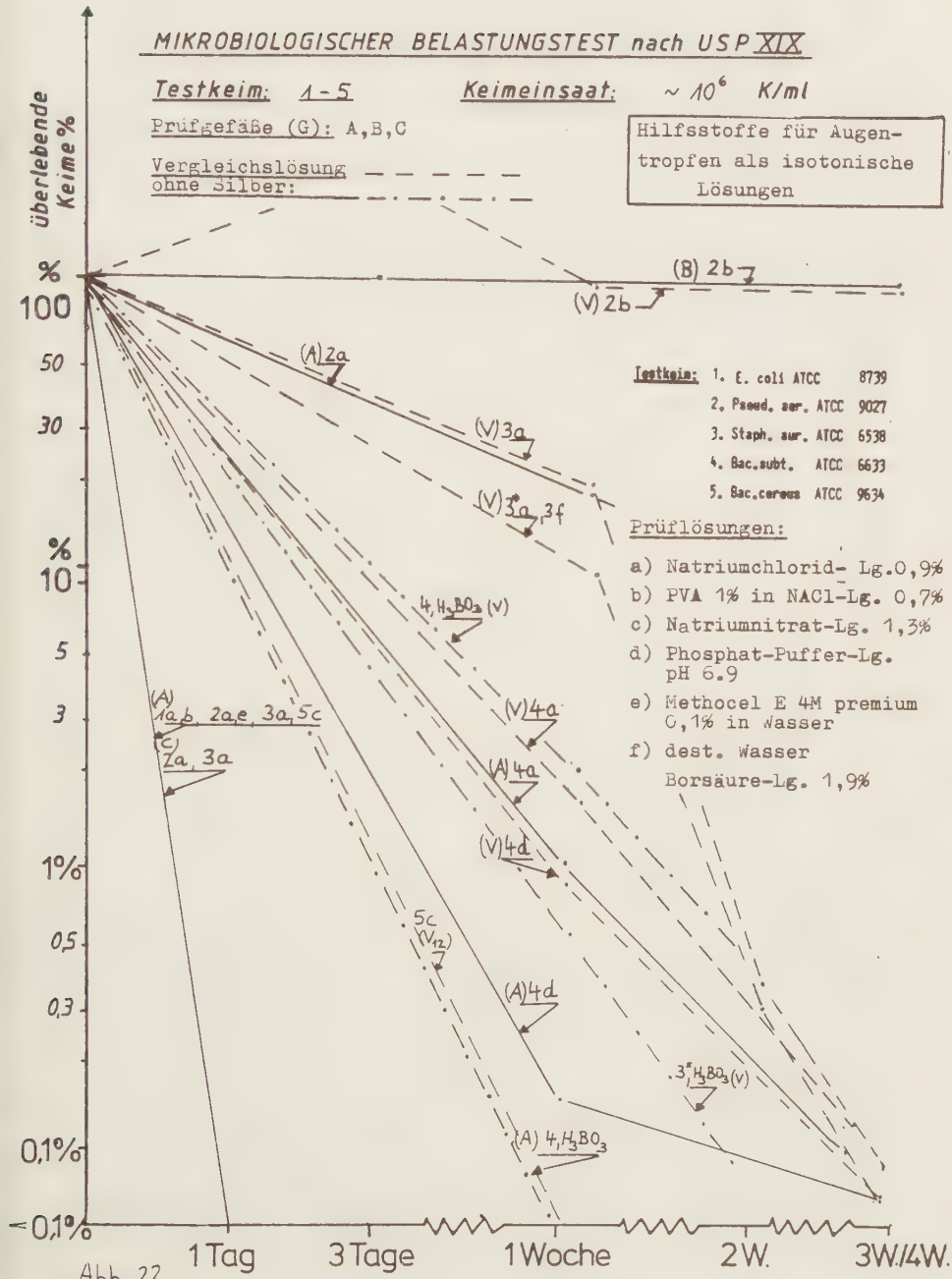

MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX
Testkeim: 1-5
Keimeinsaat: ~ 10⁶ K/ml
Prüfgefäße (G): A,B,C
Vergleichslösung ohne Silber:
Hilfsstoffe für Augentropfen als isotonische Lösungen
überlebende Keime %
%
100
50
30
%
10
5
3
1%
0,5
0,3
0,1%
≈0,1%
(B) 2b
(V) 2b
(A) 2a
(V) 3a
(V) 3a, 3f
4, H3BO3 (V)
(A) 1a,b, 2a,e, 3a, 5c
(C) 2a, 3a
(V) 4a
(A) 4a
(V) 4d
5c (V12)
(A) 4d
3, H3BO3 (V)
(A) 4, H3BO3
Testkeim: 1. E. coli ATCC 8739
2. Pseud. aer. ATCC 9027
3. Staph. aur. ATCC 6538
4. Bac.subt. ATCC 6633
5. Bac.cereus ATCC 9634
Prüflösungen:
a) Natriumchlorid- Lg.0,9%
b) PVA 1% in NACl-Lg. 0,7%
c) Natriumnitrat-Lg. 1,3%
d) Phosphat-Puffer-Lg. pH 6.9
e) Methocel E 4M premium 0,1% in Wasser
f) dest. Wasser
Borsäure-Lg. 1,9%
1 Tag
3 Tage
1 Woche
2 W.
3 W./4 W.

Abb. 22

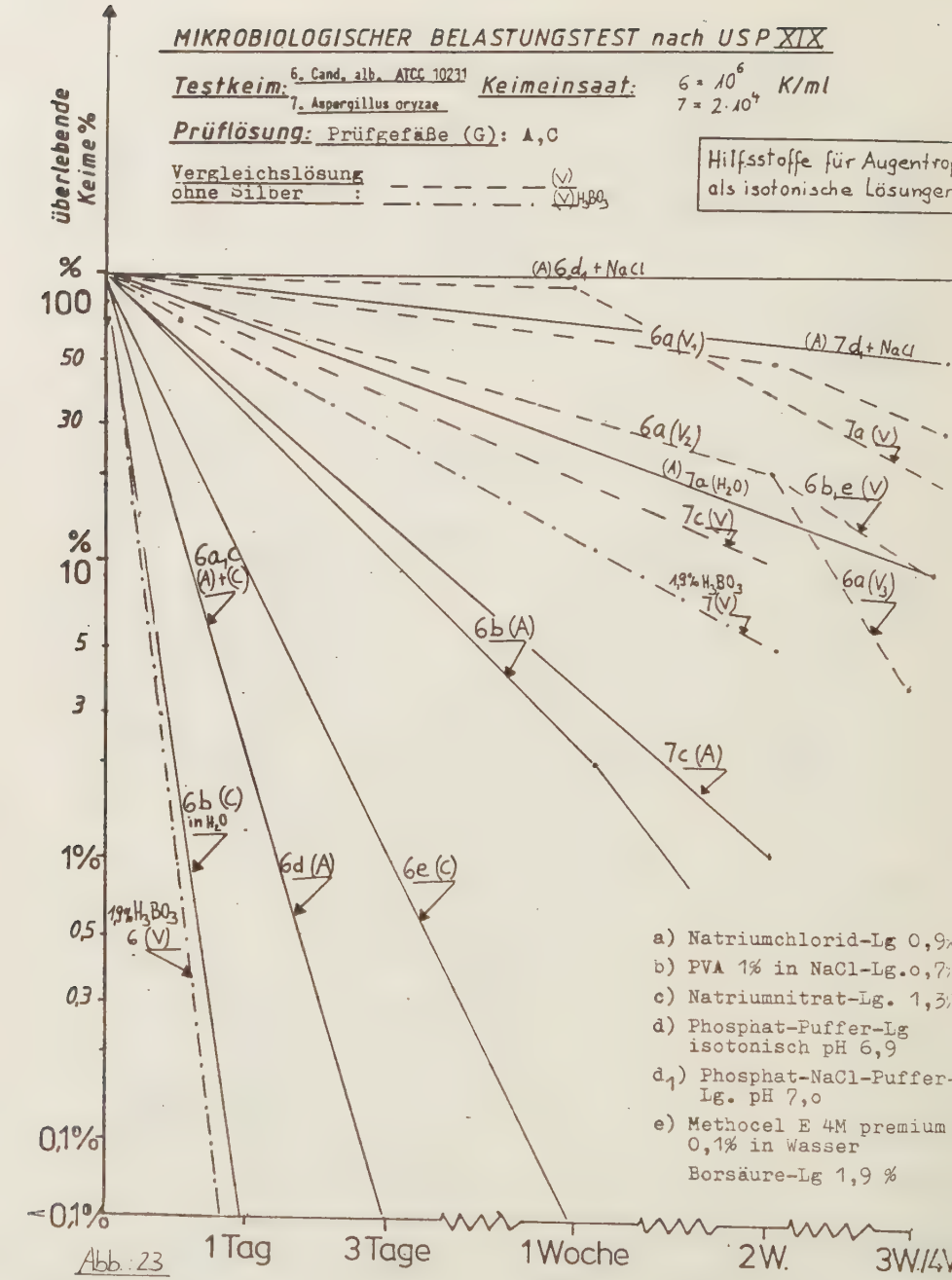

MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX
Testkeim: 6. Cand. alb. ATCC 10231
7. Aspergillus oryzae
Keimeinsaat: 6 = 10^6 K/ml
7 = 2·10^4
Prüflösung: Prüfgefäße (G): A, C
Vergleichslösung ohne Silber : (V) (V) H3BO3
Hilfsstoffe für Augentro
als isotonische Lösunger
überlebende Keime %
%
100
50
30
%
10
5
3
1%
0,5
0,3
0,1%
0,1%
(A) 6d1 + NaCl
6a(V1)
(A) 7d1 + NaCl
6a(V2)
7a(V)
(A) 7a(H2O)
6b,e(V)
7c(V)
1,9% H3BO3 7(V)
6a(V3)
6a,c (A)+(C)
6b(A)
7c(A)
6b(C) in H2O
6d(A)
6e(C)
1,9% H3BO3 6(V)
a) Natriumchlorid-Lg 0,9%
b) PVA 1% in NaCl-Lg. o,7%
c) Natriumnitrat-Lg. 1,3%
d) Phosphat-Puffer-Lg isotonisch pH 6,9
d1) Phosphat-NaCl-Puffer-Lg. pH 7,o
e) Methocel E 4M premium 0,1% in Wasser
Borsäure-Lg 1,9 %
1 Tag
3 Tage
1 Woche
2 W.
3 W./4 W.

Abb. 23

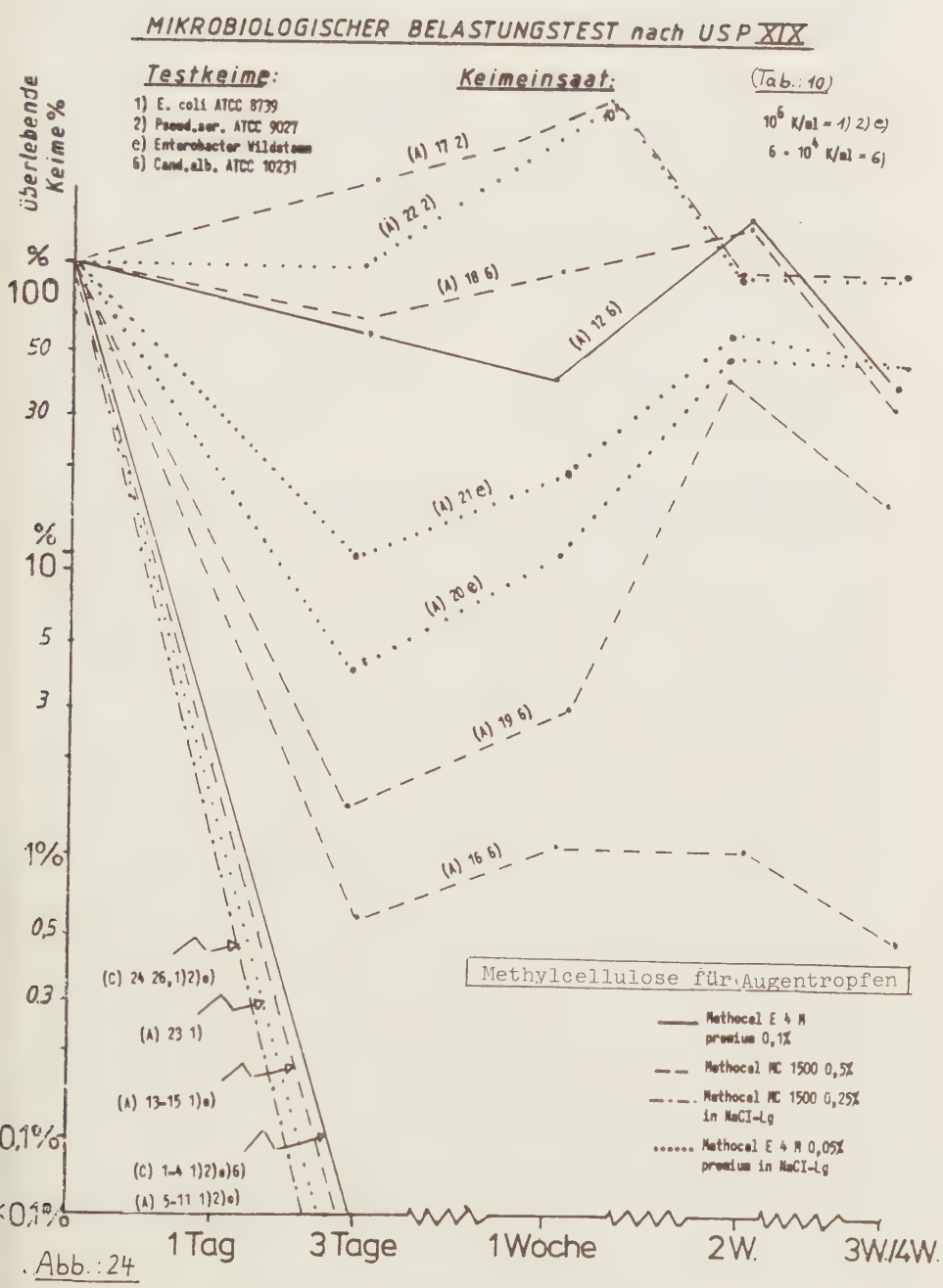

MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX
Testkeime:
1) E. coli ATCC 8739
2) Pseud.aer. ATCC 9027
e) Enterobacter Wildstamm
6) Cand.alb. ATCC 10231
Keimeinsaat:
(Tab.: 10)
$10^6$ K/ml = 1) 2) e)
$6 \cdot 10^4$ K/ml = 6)
überlebende Keime %
%
100
50
30
%
10
5
3
1%
0,5
0,3
0,1%
<0,1%
(A) 17 2)
(A) 22 2)
(A) 18 6)
(A) 12 6)
(A) 21 e)
(A) 20 e)
(A) 19 6)
(A) 16 6)
(C) 24 26, 1) 2) e)
(A) 23 1)
(A) 13-15 1) e)
(C) 1-4 1) 2) e) 6)
(A) 5-11 1) 2) e)
Methylcellulose für Augentropfen
Methocel E 4 M premium 0,1%
Methocel MC 1500 0,5%
Methocel MC 1500 0,25% in NaCl-Lg
Methocel E 4 M 0,05% premium in NaCl-Lg
1 Tag
3 Tage
1 Woche
2 W.
3 W./4 W.

Abb.: 24

### 6.2.4 Prüfung unkonservierter Augentropfen nach 4-wöchigem Gebrauch auf Kontaminanten

Der Keimgehalt in unkonservierten Augentropfen nach mehrmonatigem oder mehrwöchigem Gebrauch wurde verhältnismäßig selten untersucht, im Vergleich zu der großen Anzahl von Publikationen, die über mikrobiologische und chemische Prüfungen von Konservierungsmitteln für Augenarzneien vorliegen. Das mag daran liegen, daß sehr bald nach Bekanntwerden der ersten gravierenden Komplikationen am Auge durch kontaminierte Augenarzneien strengere Maßstäbe an deren mikrobiologische Beschaffenheit gestellt wurden und sich demnach die Untersuchungen auf den Problembereich der notwendig gewordenen Konservierungsmaßnahmen konzentrierte.
Die eingehendsten Untersuchungen in dieser Richtung führten wohl BARKMAN und Mitarbeiter (6a) durch, mit einer breit angelegten Felduntersuchung an unkonservierten Augentropfen bei über 200 Testflaschen mit den unterschiedlichsten Kompositionen. Sie kamen zu Ergebnissen, welche die vielerorts geäußerten Sorgen um den Kontaminationsgrad von Augentropfen und die damit einhergehenden strengen Anforderungen an Konservantien entkräften.
Die Augentropfen wurden nach Ablauf einer mehrwöchigen sowie mehrmonatigen Applikationszeit bei Patienten im häuslichen und klinischen Bereich auf Kontaminanten untersucht. Gefunden wurde in 3 Prüfserien:

1. Von 76 Flaschen (davon: 76% 1 Monat gebraucht) war 1 unsteril
2. Von 159 Flaschen (1 - 2 Wochen gebraucht) war 1 unsteril.
3. Von 96 Flaschen (1,5 - 9 Monate gebraucht) waren 6 unsteril.

Nach dem Ergebnis der 3. Prüfserie ist die Beschränkung der Anwendungszeit auf 4 Wochen nach dem ersten Öffnen berechtigt.
Die Wirkstoffe der Augentropfenformulierungen waren größtenteils Alkaloidsalze. Im Rahmen der Prüfungen aller verwendeten Substanzen auf antimikrobielle Eigenaktivität wurde in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen bei Tetracain eine mikrobizide Wirksamkeit gefunden.
Bei geeignetem Abgabegefäß mit fest verschraubbarer Tropfpi-

pette und bei keimfreier Bereitung der Augentropfen - beide Voraussetzungen waren hier gegeben - scheint die Kontaminationsgefahr bei begrenzter Anwendungsdauer auch in Lösungen ohne antimikrobielle Eigenaktivität nicht sehr groß zu sein. In diese Richtung lassen sich auch andere Publikationen zu diesem Themenbereich deuten: Wenn Augentropfen während des Gebrauchs stark kontaminiert vorgefunden wurden, war entweder das Gefäß ungeeignet oder die Lösung war a priori unsteril in den Handel gebracht worden. Dies soll nicht heißen, daß hier die Ansicht vertreten wird, konservierende Maßnahmen seien bei der Herstellung von Augentropfen ohne Bedeutung.

Eigene Versuche:

Prüfung von Augentropfen mit und ohne Silberung nach 4-wöchigem Gebrauch auf ihren Keimgehalt ( 2 x tgl. 2 Tr.).

Versuchsdurchführung 1 (Tab. 23)

Isotonische Trägerflüssigkeiten für Augentropfen, gesilbert,

Prüflösungen: (10 - 20 ml)
- Natriumchloridlösung 0,9%
- Natriumnitratlösung 0,1 m
- Borsäurelösung 1,5%
- Künstliche Tränenflüssigkeit DAC (= 0,9% NaCl-Lösung mit 0,5% Methylcellulose)

Silberzusatz:
1. Versilberte Plastikpipetten (Stella R)
2. Glasfritten, mit AgCl imprägniert (Retro R gläser)
3. Glasringe, mit erstarrter Schmelze aus AgCl überzogen. (Retro R gläser)

Alle Lösungen wurden im Endbehälter autoklaviert.
Geprüft wurden 18 Lösungen, davon 2 Lösungen ohne Silberzusatz als Vergleich, von denen eine (Nr. 2) zwei Wochen lang mit unverschraubter Verschlußkappe stehen blieb. Die 18 Testpersonen erhielten die Augentropfen für eine täglich zweimalige Applikation zu Hause, ohne besondere hygienische Gebrauchshinweise.
Die Ergebnisse der mikrobiologischen Prüfungen zeigen, daß 15 Flaschen noch nach 4-wöchigem Gebrauch keimfrei waren, lediglich in 3 Flaschen waren 10, 60 und 900 Keime /ml nach-

zuweisen, von denen zwei als Staph. alb. identifiziert wurden. Bei der Lösung Nr. 4 handelte es sich vermutlich um eine Sekundärkontamination auf dem Nährboden, da die flüssigen Nährmedien unbewachsen blieben. Eine antimikrobielle Wirksamkeit von Silber gegenüber Kontaminanten geht aus der Versuchsserie nicht deutlich hervor, da Vergleichslösungen nicht in genügender Anzahl getestet wurden, und zudem auch eine der beiden Vergleichslösungen keimfrei blieb.Zumindest kann man erkennen, daß selbst in nährstoffreichen Lösungen, wie die künstliche Tränenflüssigkeit, die Kontaminationsgefahr in Flaschen mit Silberdepot gering war.

Versuchsdurchführung 2 (Tab. 24)
Prüflösungen: Natriumchloridlösung 0,9% ohne Silberzusatz
Prüfgefäße: (A) Retro$^{R}$-Augentropfgläser 5 Flaschen
(B) Zentrop$^{R}$-Augentropfgläser 5 Flaschen
(C) Ophthiolen aus Polyethylen 4 Flaschen

14 Testpersonen verwendeten die Prüflösungen als Augentropfen wie unter Versuchsdurchführung 1 beschrieben. Nach 4-wöchigem Gebrauch wurden in 7 Flaschen $10^4$ - $10^6$ Keime /ml Lösung gefunden. Diesen hohen Kontaminationsgrad zeigten alle Lösungen in Zentrop$^{R}$-Augentropfgläsern (B), die durch Dampfsterilisation im Endbehälter nach der Herstellung entkeimt wurden. Dabei wurde der Gummi der Tropfer selbst bei guter Entlüftung so stark geschädigt, daß Kontaminanten eindringen konnten, obwohl Risse im Gummi zunächst mit dem Auge nicht erkennbar waren. Nach der Beanspruchung während des Gebrauchs sah man bei zwei Gefäßen deutlich undichte Stellen. Bei mehreren hundert weiteren Belastbarkeitsprüfungen der Tropfer durch Dampfsterilisation mit 120 $^{o}$C und 2 bar zeigte sich, daß die Zerreißfestigkeit des Gummis nicht hoch genug war, um Lösungen mit ausreichender Sicherheit in Gläsern mit aufgeschraubter Tropfpipette dieser Sorte autoklavieren zu können. Die Tropfer eigneten sich nur für eine Dampfsterilisation in unverschraubtem Zustand, was den Firmenangaben nicht zu entnehmen ist. Tropfer aus Silikongummi waren für eine Dampfsterilisation im Endbehälter wesentlich besser geeignet (z.B. Aponorm$^{R}$ oder Gemo$^{R}$ Augentropfflasche

Von den 4 Prüflösungen in Ophthiolen (C) waren 2 stark kontaminiert und von denen in Retro$^{R}$ - Gläsern (A) keine.
Es muß betont sein, daß hier für einen Vergleich bzgl. Kontaminationsgrad der Lösungen mit und ohne Silberung die Anzahl der Versuche nicht groß genug war und die Komposition der Testlösungen nicht übereinstimmte.Daher kann nur unter Vorbehalt von einer antimikrobiellen Wirksamkeit der Silberdepots in den Flaschen der Versuchsdurchführung 1 gesprochen werden.

Kontamination von gesilberten isotonischen Trägerflüssigkeiten nach 4-wöchigem Gebrauch (2x tgl. 2 Tropfen)

18 Testpersonen  Datum: April 1977

\+ = Wachstum, - = kein Wachstum, KZ=Keime/ml : OK = kein Wach

| Nr | Prüflösung | Ster. | KZ | | Nr. | Prüflösung | Ster. | KZ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Vergleichlösung ohne Silber Künstl.Tränenfl. | a. -<br>b. - | a. OK<br>b. OK | Sta. alb. | 10 | wie 9) | a. -<br>b. - | a.OK<br>b.OK |
| 2 | wie 1) | a. +<br>b. - | a.60K<br>b. - | | 11 | AgCl-Formlinge künstl.Tränenfl | a. -<br>b. - | a.OK<br>b.OK |
| 3 | versilberte Pip. (Stella) künstl.Tränenfl. | a. -<br>b. - | a.OK<br>a.OK | | 12 | versilberte Pip 0,7% NaCl-Lg. | a. -<br>b. - | a.OK<br>b.OK |
| 4 | wie 3) | a. -<br>b.- | b.10K<br>b.OK | | 13 | wie 12) | a. -<br>b. - | a.OK<br>b.OK |
| 5 | AgCl-Formlinge künstl. Tränenfl | a. -<br>b. - | b.OK<br>b.OK | | 14 | AgCl- Fritte 0,7% NaCl-Lg. | a. -<br>b. - | a.OK<br>b.OK |
| 6 | wie 5) | a.++<br>b. - | b. 900K | Sta. alb. | 15 | wie 14) | a. -<br>b. - | a.OK<br>b.OK |
| 7 | wie 5) | a. -<br>b. - | a.OK<br>a.OK | | 16 | AgCl-Formlinge 1,5% $H_3BO_3$-Lg. | a. -<br>b. - | a.OK<br>b.OK |
| 8 | wie 5) | a. -<br>b. - | a.OK<br>a.OK | | 17 | wie 16) | a. -<br>b. - | a.OK<br>b.OK |
| 9 | wie 5) mit $NaNO_3$-Lg. 0,1 m | a. -<br>b. - | a.OK<br>a.OK | | 18 | wie 16) | a. -<br>b. - | a.OK<br>b.OK |

Tab. 23

Sterilitätstest nach 4 Wochen:
(Ster.) 0,5ml/1o,o ml Nährbouillon

a) CSB-Bouillon
b) Sab.-Maltose Bouillon

Keime/ml (KZ) nach 4 Wochen

a) CASO - Agar
b) Sab.-Maltose Agar

Untersuchung nicht konservierter Augentropfen nach 4-wöchigem Gebrauch auf Kontaminanten

Applikation: 2 x tgl. 1 Tropfen in jedes Auge, 4 Wochen lang
Anzahl der Versuchspersonen: 14 Datum: 4.76

Prüflösung: isotonische Natriumchloridlösung
Prüfgefäße: Gläser mit fest verschraubbarer Pipette
(A) Retro® Augentropfgläser, strahlensterilisiert ( Lg. sterilfiltriert)
(B) Zentrop® Augentropfgläser, autoklaviert im Endbehälter
(C) Ophthiolen aus Polyaethylen, strahlensterilisiert " "

Der Keimgehalt der Prüflösung wurde nach 4-wöchigem Gebrauch wie folgt geprüft:
1. Sterilitätstest in flüssigen Nährmedien
2. Keimzahlbestimmung auf festen Nährböden nach dem Plattenzählverfahren
+ = Wachstum , +++ = starkes Wachstum , - = kein Wachstum

| Prüf-lösung | Sterilität | | | Keime/ml | Keimart | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | CSB Bouillon | Thioglycol. Bouillon | Sab.-Maltose Bouillon | | | |
| A-1 | - | - | + | 4 | aerobe -Bakt. | |
| A-2 | - | - | - | 2 | / | |
| A-3 | - | - | - | kein W. | / | |
| A-4 | - | - | - | kein W. | / | |
| A-5 | - | - | - | kein W. | / | |
| B-1 | + | + | + | $16.10^4$ | aerobe Bakt. | |
| B-2 | + | + | + | $3,4.10^6$ | " " | poröser Gummi |
| B-3 | + | + | + | $2.\ 10^3$ | " " | poröser Gummi |
| B-4 | + | - | - | $4.\ 10^3$ | Kokken | |
| B-5 | + | + | + | $26.10^6$ | gram pos. Stäbchen | |
| C-1 | + | / | + | +++ n.z. | aerobe Bakt. | |
| C-2 | / | / | / | 3 | aerobe Bakt. Alcaligenes | |
| C-3 | / | / | / | kein W. | | |
| C-4 | / | / | / | $1,7.10^7$ | Enterobacter. | |

Die Lösungen B-1 bis C-1 waren nach 4- wöchigem Gebrauch getrübt.

Tab.: 24

## 7 Silberanalytik im ppb-Bereich in wäßrigen Lösungen

### 7.1 Material und Methoden

Es ging darum, den Gehalt an freiem und gebunden vorliegendem Silber in den unter Kap. 6 aufgeführten Prüflösungen zu bestimmen, welche in den Testflaschen mit "Silber-Depots" bei Raumtemperatur liegend gelagert wurden. Die Lagerzeiten wurden unterschiedlich gewählt, um Hinweise auf die Lösungsgeschwindigkeit zu erhalten. Für die Silberbestimmungen wurden drei Methoden in der Weise ausgewählt, daß Arbeitsaufwand und apparative Einrichtungen in einen sinnvollen Zusammenhang zu der erforderlichen Genauigkeit gebracht wurden. Da die Silberanalytik im ppb-Bereich bei geringer Fehlerbreite des Verfahrens an sich sehr aufwendig ist und es bei den Löslichkeitsbestimmungen nur um annähernde Werte ging, konnten bei den Methoden Fehler um 10% akzeptiert werden.

Verfahren I: potentiometrisch mit ionenspezifischer Elektrode

Geräte: Potentiometer Typ E 532 Metrohm (Genauigkeit $\pm$1 mV)
Ionenspezifische Kristallmembranelektrode mit einem Kristallpressling aus Silbersulfid als Sensor.
Typ EA 306 - S/Ag Metrohm
Referenzelektrode mit Zwischenelektrolyt
Typ EA 437 - Ag/AgCl Metrohm
Elektrolytlösung: ges. KCl/ 1m KCl (als Zwischenelektrolyt)

Literatur: (9, 14, 21, 22, 73, 86)

Erwünschter Meßbereich: $10^{-4}$ - $10^{-7}$m $Ag^+$

Eichsubstanz: Silbernitrat (Arzneibuchqualität, getrocknet)

Eichlösungen: $10^{-1}$-$10^{-7}$m $Ag^+$ als $AgNO_3$, Aufbewahrung: braune Gefäße PVC oder Glas

Haltbarkeit: $10^{-1}$-$10^{-3}$m : 3 Wochen
$< 10^{-3}$m : 1 Woche

TISAB[1] - Puffer: 5m $NaNO_3$-Lösung, 2ml/100,o, Ionenstärke: 0,1m

[1] Total Ionic Strength Adjustment Buffer

Meßtemperatur: 25 °C
Genauigkeit: ± 2 mV (= ± 8% Analysenfehler im linearen Bereich)
Störungen: (Substanzen in den geprüften Lösungen)
$Cl^-$ Ionen $> 10^{-3}$ m, also NaCl, Pilocarpin-HCl,
Tetracain-HCl, Ethylmorphin-HCl
Methylcellulose, Proteine (Pepton, Mikroorganismen)
Chloridionen blockieren den Sensor der Meßelektrode, die Elektrode ist erst nach Reinigen in 0,005 m $NH_4OH$-Lösung und 0,05 m $S^{2-}$-Lösung mit anschließendem Wässern wieder gebrauchsbereit.
Das Sensorelement der ionenspezifischen Elektrode spricht auf freie Silberionen potentialbildend an, wobei die Silberionenaktivität in der Prüflösung gemessen wird.

$$[1] \qquad E = E_o + \frac{2.303\ RT}{F} \cdot \lg\ a_{Ag^+} = E_o + S \cdot \lg\ a_{Ag^+}$$

E = Elektrodenpotential
$E_o$ = Standardpotential der Meßkette
S = Elektrodensteilheit, Nernstfaktor
$a_{Ag^+}$ = Aktivität der Silberionen in der Prüflösung
Bei $Ag^+$ - Ionenkonzentrationen $> 10^{-6}$ m wurde nach der Nernst'schen Gleichung [1] ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Potentialdifferenz Meßelektrode/Vergleichselektrode und dem Logarithmus der $Ag^+$ - Ionenkonzentration gefunden, wenn nach der Methode der fixierten Ionenstärke unter Zusatz einer TISAB-Lösung gearbeitet wird. Die Steilheit der Elektrode wurde vor jeder Konzentrationsmessung neu durch Vermessen einer Eichkurve bestimmt. Im Konzentrationsbereich unter $10^{-6}$ m nahm die Steilheit deutlich ab. Bei schleppender Potentialeinstellung von 5 - 10 Min. stieg der Analysenfehler wegen des gekrümmten Verlaufs der Eichkurve auf ca. 20% (< 50 µg $Ag^+$ /l). Entgegen den Angaben der Hersteller konnte auch im höheren Konzentrationsbereich kein völlig linearer Verlauf der Eichkurve gefunden werden, eine Erscheinung, die sich aus der Querempfindlichkeit der Meßelektrode und Ion-Ion- sowie Ion-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Silberionen und anderen Substanzen der Lösung ergab.

Zur Bestimmung der Gesamtsilberkonzentration (freie und komplex gebundene Silberionen) wurde die Prüflösung mit konz. Salpetersäure eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und das Potential gemessen.

Komplexometrische Bestimmung des Silbergehalts mit Dithizon

Für die Bestimmung der Silberionenkonzentration in sehr kleinen Probemengen aus Augentropfenflaschen eignete sich eine kolorimetrische Gehaltsbestimmung mit Dithizon nach IWANOWITSCH (53). Mit diesem relativ unkomplizierten Verfahren lassen sich in bereits 2 ml Probelösung Mengen unter 1 µg Silber nachweisen, bei einer Fehlerbreite von 5 - 10% und einer Nachweisgrenze von ~50 µg $Ag^+$ /l . Als Reagenzien wurden nur analysenreine Substanzen, insbesondere solche für Bestimmungen mit Dithizon ($H_2DZ$) verwendet.

Arbeitsvorschrift:

Reagenzlösung: 1. $H_2DZ$ / $CCl_4$ , 10 µm ≙ 2,56 µg $H_2DZ$ /ml
2. $H_2SO_4$ , 2 n

$Ag^+$ - Eichlösung: $AgNO_3$ /0,1 n $HNO_3$, 2,5 µm ≙ 0,27 µg $Ag^+$ /ml

Haltbarkeit: Die Dithizonlösung ist unter $H_2SO_4$ 1%-ig aufbewahrt, 3 Tage haltbar. Die Silbernitrat-Eichlösung ist eine Woche haltbar.

2 ml Untersuchungslösung werden in einem verschraubbaren Reagenzglas mit 2 ml $H_2SO_4$ und 2 ml dest. Wasser gemischt. Aus einer Mikrobürette wird mit der Dithizon-Reagenzlösung unter kräftigem Schütteln bis zum Farbumschlag nach gelbgrün titriert.

Gegenprobe: Die abgelesene Menge Dithizon wird vorgelegt, dann wird analog mit $Ag^+$ - Eichlösung auf den gleichen Farbton titriert.

Eine spektralphotometrische Auswertung ergab keine Verbesserung der Genauigkeit gegenüber der kolorimetrischen Endpunktsbestimmung.

Störungen durch andere Substanzen der geprüften Lösungen: $Cl^-$ - Ionen, Methylcellulose, Polyvinylalkohol.

In allen chloridhaltigen Lösungen wurde die Gesamtsilberkonzentration nach Aufschluß der Probe durch Eindampfen mit $HNO_3$ 65% bestimmt.

Silberbestimmung durch Atomabsorption (ASS)[1]
Gerät: Perkin Elmer ASS 300
In einigen Lösungen wurden die frei + gebunden vorliegenden Silbermengen durch ASS bestimmt. Die Lösungen ohne viskositätserhöhende Zusätze konnten ohne vorherigen Aufschluß mit einer Genauigkeit von 99% geprüft werden. (Nachweisgrenze: ca. 50 µg Ag /l)

## 7.2 Löslichkeit von Silber aus "Silber-Depots" in verschiedenen nicht inoculierten Prüflösungen

Es galt zu prüfen, in welcher Höhe sich Silber aus den verschiedenen Silberchlorid, Silberbromid und Silber/Silberoxidüberzügen der nach den Ausführungen in Kap. 5 präparierten Augentropfgläser löste. Die Flaschen wurden liegend bei Raumtemperatur gelagert. Bestimmt wurde der Gehalt an frei und gebunden vorliegendem Silber nach Lagerzeiten von einigen Stunden bis zu mehreren Monaten, um auf diese Art einen Hinweis auf die Lösungsgeschwindigkeit von Silber aus den verschiedenen "Silber-Depots" zu erhalten. Weiterhin galt es zu erfahren, in welcher Weise sich die Komposition der Lösung auf die Silberlöslichkeit auswirkte und in wieweit sich eine Konstanz in der Silberabgabe bei gleichen Lösungen und gleichen Testflaschen erzielen ließ.
Die Ergebnisse sind in den Tabellen 25 - 27 zusammengefaßt, geordnet nach Testflaschen mit den verschiedenen Silbereinlagen sowie nach Prüflösungen. Der Silbergehalt wurde in $Ag^+$/l (Silberionenkonzentration) und teilweise in Ag /l (Gesamtsilberkonzentration) angegeben. Die nach einem der 3 oben angegebenen Analysenverfahren ermittelten angeführten Zahlenwerte sind die Mediane aus jeweils 2 - 3 Bestimmungen. Eine Zweitprüfung in derselben Testflasche nach längerer Lagerzeit ist auf derselben Zeilenreihe angegeben.
Man erkennt aus den Ergebnissen, daß Silber aus allen "Depots" in oligodynamischen Mengen von 50 - 600 µg/l abgegeben wurde.

---

[1] Die Untersuchungen wurden am "Chemischen Untersuchungsamt Trier" ausgeführt.

Wesentliche Unterschiede in der Silberlöslichkeit aus den verschiedenen Depots waren nicht zu erkennen, die Streubreite war bei allen hoch, am höchsten bei den präparierten AgCl-Fritten. Eine Korrelation zwischen Komposition der Lösung und Silberabgabe ist nicht ersichtlich. Die Lösungsgeschwindigkeit aus Ag/AgO- Überzügen (Stella$^{R}$ Flaschen) überstieg diejenige der Silberhalogenidformlinge aus den Zentrop-Flaschen.
Die Silberoberflächen schienen je nach Herstellungsbedingungen und Alterung so unterschiedlich strukturiert zu sein, daß sich daraus evtl. die Differenzen in der Lösungstension von Silber erklären lassen (s. Kap. 8 REM-Aufnahmen).

### 7.2.1 Silberabgabe durch versilberte Augentropfer (Stella$^{R}$) an die Prüflösung (Tab. 25)

In 19 Lösungen wurde der Gehalt an freien Silberionen, in einer NaCl-Lösung derjenige an Gesamtsilber bestimmt. Die Sättigung wird nach ca. einem Tag erreicht. 4 Tropfer wurden in 200 ml Prüflösung eingebracht. Wenn man diese unberücksichtigt läßt, erbrachte eine Auswertung nach der "t-Verteilung" (Student) folgende Ergebnisse: (Angabe: $\mu$g $Ag^{+}$ /l)

| | | | |
|---|---|---|---|
| N | = | 16 | N = Anzahl der Bestimmungen |
| m | = | $314{,}9 \pm 84{,}2$ | m = Mittelwert ($\alpha$ = 5%) |
| | | | $\mu$ = Mittelwert der Grundgesamtheit |
| s | = | 158,1 $\quad s_m = 39{,}5$ | s = Standardabweichung |
| R | = | 600 - 50 (610) | $s_m$ = Standardabweichung des Mittelwertes: $\frac{s}{\sqrt{N}}$ |
| R | = | $x_{max} - x_{min}$ | $\alpha$ = Irrtumswahrscheinlichkeit |
| | | | R = Variationsbreite der Ergebnisse |

$$m - \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}} < \mu < m + \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}}$$

7.2.2 Silberabgabe durch Formlinge und Ringe, die mit einer erstarrten Schmelze aus AgCl oder AgBr überzogen wurden, an die Prüflösung (Tab. 25, 26, 27)[1]

Geprüft wurden 39 Testfläschchen, davon 31 Zentrop-Augentropfgläser mit AgCl-Ringen, 6 mit AgCl-Formlingen und 2 mit AgBr-Formlingen. Die geringe Lösungsgeschwindigkeit von Silber aus den Silberhalogenidschmelzen ist deutlich zu erkennen, da eine Sättigung meist erst nach mehreren Tagen erreicht wird.
Wenn man den Silbergehalt der Prüflösungen in Tab. 26, welche keine Komplexbildner enthalten, womit die Gesamtsilberkonzentration und die Silberionenkonzentration gleichzusetzen sind, statistisch auswertet, erhält man folgende Ergebnisse:

Angabe: µg $Ag^+$ /l

N = 23
m = 417,7 ± 93,3 ($\alpha$ = 5%)
s = 223,3 $s_m$ = 46,6
R = 780 - 130 (650)

jeweils die höchsten Werte nach 2 Mon. wurden gezählt.

Außerdem wurden 9 NaCl-Lösungen mit AgCl-Ringen geprüft. Der Silbergehalt der Lösung ist in Tab. 26 als Gesamtsilbergehalt angegeben. Angabe: µg Ag/ l

N = 9
m = 328,3 ± 130,4 ($\alpha$ = 5%)
s = 170 $s_m$ = 56,7
R = 750 - 165 (585)

nach 12 T. - 2 Mon.

Die Erläuterungen zur statistischen Auswertung sind dem voranstehenden Kap. 7.2.1 zu entnehmen.
Angaben zur Silberlöslichkeit von der Oberfläche einiger Silberchlorid- und Silberbromidformlinge können Tab. 25 und 27 entnommen werden.

[1] weitere Angaben zur Löslichkeit: Tab. 30 und 32

### 7.2.3 Silberabgabe durch AgCl- imprägnierte Glasfritten an die Prüflösungen

Auch hier erkennt man aus Tab. 27 eine geringe Lösungsgeschwindigkeit über mehrere Tage und große Unterschiede in den Silberkonzentrationen. Geprüft wurden 18 Lösungen, der Gehalt wird angegeben als µg $Ag^+$ /l .

N = 18
m = 266,3 ± 99 ( $\alpha$ = 5%)
s = 200,5 $s_m$ = 47.1
R = 825 - 42 (783)

Obwohl bereits die Lösung mit dem kleinsten Silbergehalt (25 µg $Ag^+$ /l) nicht in die Berechnung einbezogen wurde, waren die Differenzen in der Silberabgabe, wie die hohe Standardabweichung zeigt, hier am weitreichendsten. Diese Ergebnisse sind auf die schlechte Reproduzierbarkeit der Silberchloridfällung in die Poren der Fritten zurückzuführen.

Zum Vergleich wurde die Löslichkeit von Silberchlorid-Substanz in Wasser und Borsäurelösung geprüft (Tab. 25). Potentiometrisch ließen sich in Wasser ca. 1000 µg $Ag^+$ /l und in Borsäurelösung 500 µg $Ag^+$ /l bei 25°C nachweisen.

### 7.3 Silbergehalt in verschiedenen inoculierten Prüflösungen nach 1 - 6-monatiger Lagerung

Nach Ablauf der mikrobiologischen Prüfungen wurde in den Testflaschen der Silbergehalt bestimmt um zu prüfen, wie groß der noch in der Lösung verbliebene ionogene und der an die Masse der Bakterien gebundene Silberanteil näherungsweise war. Für Lösungen ohne Komplexbildner kann man den nach Eindampfen mit $HNO_3$ bestimmten Anteil ( = Gesamtsilber) direkt mit der Summe der an die Mikroorganismen gebundenen + ionogen vorhandenen Silbermenge gleichsetzen. Schwebstoffe und ihre Adsorptionseigenschaften gegenüber Silber bleiben unberücksichtigt.

Aus den Tabellen 28 und 29 geht deutlich hervor, daß in allen Lösungen, bei denen die freien + gebundenen Silberanteile bestimmt wurden, der komplex gebundene Anteil wesentlich größer als der ionogen vorliegende war. Unabhängig von der Art der Ag-Bindung wies der Silbergehalt in den einzelnen Lösungen große Unterschiede auf, die weder mit der Art der Testflaschen , der Komposition der Formulierungen noch mit der antimikrobiellllen Wirksamkeit in irgenteiner ersichtlichen Art korrelierten.

Nach einer Woche waren in allen Lösungen weniger als 0,1% der eingesäten Keime nachweisbar, mit Ausnahme der 2 Lösungen der Tab. 11 und 14, die mit *bezeichnet wurden.

SILBERGEHALT

| Präflösung nicht inoculiert | G | M | Lager-zeit | $Ag^+$-Geh. µg/ l | Lager-zeit | $Ag^+$-Geh. µg/ l |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Phosphat-Pufferlösung | C | II | 9 Mo. | 80 | | |
| $NaNO_3$-Lösung 0,1 m | C | I | 1 Tag | 660 | | |
| " " " | C | I | 1 Tag | 440 | 2 Mon. | 442(M II) |
| " " " | C | I | 1 Tag | 187 | | |
| " " " | C | I | 6 h | 94 | 1 Tag | 185 |
| " " " 200 ml | C | I | 6 h | 99 | 1 Tag | 99 |
| " " " | C | I | 6 h | 55 | 1 Tag | 55 |
| " " " | C | I | 6 h | 51 | 1 Tag | 72 |
| " " " | C | I | 1 Tag | 396 | | |
| Wasser, dest. | C | I | 1 Tag | 400 | | |
| " " | C | I | 1 Mo. | 350 | | |
| " " | C | II | 6 Wo. | 410 | 8 Wo. | 430(M I) |
| " " | C | I | 2 T. | 300 | | |
| " " 10 Min. 80°C | C | I | 1 Tag | 385 | | |
| " " 10 Min. 80°C | C | II | 1 Wo. | 316 | 1 Mon. | 350 |
| " " + PVA 1 % | C | I | 2 T. | 50 | | |
| Borsäure-Lösung 3% | C | I | 1 Wo. | 400 | | |
| Natriumnitratlösung o,1m | C | I | 6 Mo. | 130 | | |
| Atropinsulfat Augentr. | C | I | 3 Mo. | 165 | | |
| DAC c.Methylcellulose o,5% | | | | | | |
| Natriumchloridlösung o,9% | C | II | 1 Mo. | 350 Ag/l | | |
| Natriumnitratlösung o,1m | E | I | 2 h | 242 | | |
| Wasser, dest. | E | I | 24 h | 110 | | |
| " " | E | I | 24 h | 110 | | |
| " " | E | I | 25 h | 176 | | |
| " " | E | I | 24 h | 143 | | |
| " " | E | I | 2 Mo. | 770 | | |
| AgCl gesättigt in dest. Wasser | I | | 1 Wo. | 900 | 4 Wo. | 900 |
| " " " " | I | | 4 Wo. | 1080 | | |
| " " in $H_3BO_3$ 1,3% | I | | 4 Wo. | 500 | | |

Tab.:25

Methode (M)

I potentiometrisch

II komplexometrisch (Dithizon)

Gefäß (G)

C versilberte Pipette(Ste

E AgCl-Formlinge(erstarrt

Schmelze auf Siedestein

SILBERGEHALT

| Prüflösungen, nicht inoculiert | Lagerzeit | M | $Ag^+$-Gehalt µg/l | Gesamtsilber µg/l |
|---|---|---|---|---|
| Wasser, dest. | 5 Tage | II | 330 | |
| " " | 10 Mon. | II | 650 | |
| " " | 4 Tage | III | | 630 |
| " " | 4 Tage | III | | 585 |
| Natriumnitratlösung 0,1 m | 2 Tage | I | 440 | |
| " " | 2 Tage | I | 473 | |
| " " | 2 Tage | I | 605 | |
| " " | 5 Tage | I | 605 | |
| " " | 2 Wo. | II | 830 | |
| " " | 2 Wo. | II | 780 | |
| " " | 2 Mo. | I | 660 | |
| " " | 2 Mo. | I | 220 | |
| Borsäurelösung 1,5% | 5 Tage | II | 215 | |
| " " | 12 Tage | II | 99 ( 154,: 2 Mon.) | |
| " " | 7 Tage | II | 623 | |
| " 2 % | 4 Tage | III | | 630 |
| " " | 4 Tage | III | | 425 |
| Pilocarpin-$NO_3$ 1% in $NaNO_3$ Lg. | 1 Mon. | II | 231 | |
| " " " | 12 Tage | II | 396 (440,: 2 Mon.) | |
| Zinksulfat-Augentropfen DAC | 12 Tg. | II | 198 (168,: 2 Mon. M:I) | |
| " " " | 12 Tg. | II | 165 (275,: 2 Mon. M:I) | |
| " " " | 2 Mo. | I | 275 | |
| " " " | 2 Mo. | I | 130 | |
| Natriumchlorid-Lösung 0,7% | 12 Tage | II | | 347 |
| " " | 12 Tage | II | | 297 |
| " " | 12 Tage | II | | 248 |
| " " | 12 Tage | II | | 165 |
| " gleiche Flasche | 2 Mon. | II | | 198 |
| Natriumchlorid-Lösung 0,7% | 4 Tage | III | | 300 |
| Phosphat-Pufferlösung pH 6,9 | 2 Mon. 12 Tg. | I II | 3 Flaschen: 300, 360, 750 396 | |

Tab. 26

Methode (M)

I potentiometrisch

II komplexometrisch (Dithizon)

III Atomabsorption

Gefäße

Keramikring mit erstarrter AgCl-Schmelze überzogen in Zentrop- Tropfpipetten

SILBERGEHALT

| Prüflösung, nicht inoculiert | M | Lagerzeit | $Ag^+$-Geh. µg/l | M | Lagerzeit | $Ag^+$-Geh. µg/l |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pilocarpin-$NO_3$ 1% in isot. $NaNO_3$- Lösung | II | 1 Mon. | 825 | | | |
| " " " | II | 1 Mon. | 231 | | | |
| Wasser, dest. | II | 1 Mon. | 594 | | | |
| " " | II | 1 Mon. | 380 | | | |
| " " | II | 1 Mon. | 388 | | | |
| " " | II | 1 Mon. | 40 | | | |
| " " | I | 1 Tag | 263 | | | |
| " " | I | 1 Tag | 273 | | | |
| " " | I | 1 Tag | 310 | | | |
| " " | I | 2 h | 33 | I | 1 Tag | 242 |
| " " | I | 2 h | 72 | I | 1 Tag | 352 |
| " " | I | 1 Tag | 50 | II | 6 Wo. | 230 |
| " " | I | 1 Tag | 40 | II | 6 Wo. | 54 |
| Borsäurelösung 1,5 % | II | 6 Wo. | 100 | | | |
| Natriumnitratlösung 1,3% | II | 10 Tg. | 99 | | | |
| " " | I | 1 Tag | 55 | II | 2 Mon. | 250 |
| " " | I | 1 Tag | 33 | | | |
| " " | I | 1 Tag | 110 | I | 5 Wo. | 120 |
| " " | I | 1 Tag | 39 | I | 5 Wo. | 42 |
| " " | I | 3 h | 25 | | | |
| 1) " " | I | 3 h | 77 | | | |
| 1) " " | I | 3 h | 55 | | | |

Tab.: 27

Methode (M)

I potentiometrisch

II komplexometrisch mit Dithizon

Gefäße (G)

Silberchlorid - Fritten in Zentrop-Tropfpipetten

1) Silberbromid-Formlinge (erstarrte Schmelze auf Siedesteinen)

## SILBERGEHALT

Testflaschen inoculiert: Mikrobiologischer Belastungstest lt. Tab.-Nr.
Silberbestimmung: 2-6 Monate nach der Keimeinsaat

(Fortsetzung: Tab.29)

| Tab. Nr. | Vers. Nr. | Prüflösung inoculiert | G | M | $Ag^+$-Geh. µg/l | Gesamtsilber µg/l |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 11 | 4 | Pilocarpin-HCl 1% in NaCl-Lg | A | III | | 425 |
| 11 | 5 | " " | A | III | | 515 |
| * 11 | 6 | " " | B | III | | 470 |
| 11 | 7 | " $NaNO_3$-Lg | A | I | | 100 |
| 11 | 8 | " " | B | III | | 85 |
| 11 | 9 | Pilocarpin-$NO_3$ in $NaNO_3$-Lg. | A | III | | 40 |
| 11 | 10 | wie 9) + 1% Polyvinylalkohol | A | I | 300 | |
| 12 | 9 | Pilocarpin-$NO_3$ in $NaNO_3$-Lg. | A | III | | 85 |
| 12 | 12 | wie 9) + 1% Polyvinylalkohol | A | I | 145 | |
| 12 | 18 | Zinksulfat Augentropfen DAC | A | I | 330 | 850 |
| 13 | 1 | Atropinsulfat Augentropfen | A | II+III | 150 | 180 |
| 13 | 1 | " " | A | II | 50 | |
| 13 | 5 | Pilocarpin-HCl in NaCl-Lg. | A | III | | 675 |
| 13 | 6 | " " | B | III | | 440 |
| 13 | 7 | " " | A | III | | 415 |
| 13 | 8 | " $NaNO_3$- Lg. | A | I | | 125 |
| 13 | 16 | Natriumchloridlösung 0,7% | A | I | | 130 |
| 13 | 2 | Atropinsulfat Augentr. DAC | C | II | 830 | |
| * 14 | 1 | " " | C | II | 40 | |
| 14 | 4 | Zinksulfat Augentr. DAC | B | I | 230 | 374 |
| 14 | 12 | Natriumnitratlösung 0,1 m | A | I | | 760 |
| 15 | 1 | Atropinsulfat Augentr. DAC | A | II +III | 190 | 415 |
| 15 | 2 | " " | A | II + I | 150 | 480 |

Tab: 28

Methode (M)

I potentiometrisch
II komplexometrisch (Dithizon)
III Atomabsorption

Gefäße (G)

A Silberchloridring (Zentrop-Fl.)
B Silberchlorid-Fritte "
C versilberte Pipette (Stella)

SILBERGEHALT (Fortsetzung)

| Tab. Nr. | Vers. Nr. | Prüflösung inoculiert | G | M | $Ag^+$-Geh. µg /l | Gesamtsi. µg /l |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 15 | 4 | Pilocarpin-$NO_3$ in $NaNO_3$-Lg. | A | I | 418 | |
| 15 | 7 | wie 4) + 1% Polyvinylalkohol | A | I | 190 | |
| 15 | 18 | Natriumnitratlösung 1,3% | A | I | 187 | |
| 15 | 20 | isot. Phosphatlösung pH 6,9 | A | I | 21 | 715 |
| 15 | 22 | dest. Wasser + Polyvinylalkohol 1% | C | I | 350 | |
| 15 | 15 | Natriumchloridlösung 0,7% | A | III | | 85 |
| 15 | 17 | " " | C | III | | 40 |
| 18 | 1 | PilocarpinHCl in NaCl-Lösung | C | III | | 450 |
| 18 | 3 | Pilocarpin-$NO_3$ " | C | III | | 215 |
| 18 | 22 | Zinksulfat Augentropfen DAC | B | I | 0 | 220 |
| 20 | 2 | Pilocarpin-$NO_3$ in $NaNO_3$-Lg. | C | III | (E.coli) | 150 |
| 20 | 2 | " " | C | I | (St.aur) | 154 |
| 20 | 4 | " " | A | III | (St. aur) | 70 |
| 20 | 4 | " " | A | III | ( E.coli) | 110 |
| 20 | 3 | Pilocarpin-HCl in NaCl-Lg. | A | I | | 140 |
| 23 | 14 | Natriumchloridlösung 0,7% | B | III | | 600 |
| (Abb. | 12) | dest. Wasser | B | I | 40 | |
| Abb. | 1 | dest. Wasser | E | I | 132 | |
| 16 | 2 | " " | E | I | 450 | |
| 16 | 3 | " " | E | I | 220 | |
| 17 | 3 | " " | E | I | 53 | |
| 17 | 2 | Borsäurelösung 2% | E | I | 62 | |

Tab:29

Methode (M)

I potentiometrisch

II komplexometrisch(Dithizon)

III Atomabsorption

Gefäße (G)

A Silberchloridring (Zentrop-

B Silberchlorid-Fritte "

C versilberte Pipette (Stella

E AgCl-Formlinge (erstarrte Schmelze auf Siedesteinen)

* Keimreduktion- 99,9% nach 1 Woche- nicht erreicht

## 7.4 Silberionenverluste aus der Lösung durch Bindung an makromolekulare Hilfsstoffe

Da eine Hemmung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Silber durch makromolekulare Hilfsstoffe sowohl häufig beschrieben als auch bei den eigenen Versuchen beobachtet wurde, sollten die Komplexierungseigenschaften solcher Substanzen gegenüber Silber überprüft und eine sich evtl. ergebene Abnahme der Silberionenkonzentration in der Lösung auf potentiometrischem Wege ermittelt werden.
Geprüft wurden die beiden Hilfsstoffe Methylcellulose und Polyvinylalkohol in den üblicherweise in Augentropfen verwendeten Konzentrationen.
Analysenmethoden: 1. potentiometrisch mit ionenselektiver Kristallmembranelektrode Ag/S (Kap. 7.1)
2. spektralphotometrisch

1. Methylcellulose (MC) = Methocel MC 1500$^{R}$ 0,25%

(Der Gehalt an freien Silberionen wurde mit 0,25% MC-Zusatz nach verschiedenen Zeiten potentiometrisch bestimmt)

| | Prüflösung | E/ mV ohne MC | E/ mV mit MC | nach Min./Tagen | µg $Ag^+$/l ohne MC | µg $Ag^+$/l mit MC |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 m $NaNO_3$-Lg. | 195 | 195 | | | |
| 2. | 0,1 m $NaNO_3$-Lg. mit $5.10^{-6}$ m $Ag^+$/l | 260 | 255 | 5 Min. | 550 | |
| | | | 245 | 15 Min. | | |
| | | | 233 | 1 Tag | | |
| | | | 220 | 2 Tage | | 90 |
| 3. | wie 2. | 260 | 221 | 1 Tag | 550 | 100 |
| 4. | wie 2. | 260 | 223 | 1 Tag | 550 | 110 |
| 5. | AgCl-Ring in 0,1 m $NaNO_3$-Lg. | 257 | 230 | 15 Tagen | 440 | 121 |
| 6. | wie 5. | 260 | 230 | 15 Tagen | 605 | 130 |

Damit wurde gezeigt, daß Silberionen ziemlich gleichmäßig aus der Lösung an Methylcellulose gebunden werden. Übereinstimmend verbleibt in allen Testlösungen ein potentiometrisch nachweisbarer Anteil freier Silberionen von ca. 100 $\mu g$ $Ag^+$ /l.

Polyvinylalkohol 1% (PVA)

Der Gehalt an freien Silberionen wurde mit und ohne Zusatz von 1% PVA potentiometrisch bestimmt.

| | Prüflösungen | E/ mV ohne PVA | E/ mv mit PVA | Zeit nach | $\mu g$ $Ag^+$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 m $NaNO_3$-Lg. + 5. $10^{-6}$ m $Ag^+$/l | 26o | 259-260 | 1 Std. -2 T. | 550 |
| 2. | wie 1. $10^{-5}$m $Ag^+$/l | 299 | 297 | 10 Tagen | 1080 - 990 |
| 3. | AgCl-Ringe in 0,1 n $NaNO_3$-Lg. | 255 | 272 | 1 Tag | 275 600 |
| | | | 293 | 3 Tg. | 900 |
| | | | 298 | 10 Tg. | 1050 |

Eine Komplexierung von Silber durch PVA ließ sich nicht nachweisen, denn das Potential der Lösung 1. blieb über 2 Tage hinweg unverändert, das der Lösung 2. nahm geringfügig ab (normaler $Ag^+$ -Verlust aus $AgNO_3$-Lösungen durch Wandadsorption) und bei Lösung 3. war der Potentialanstieg durch einen langsamen Anstieg der Silberionenkonzentration bis zur Sättigung zu erklären. Die Silberabgabe aus den AgCl-Ringen überstieg die erwartete Höhe, da die Lösung zum Lösen des PVA zum Sieden erhitzt wurde.

Spektralphotometrisch: PVA absorbiert im UV-Bereich bei 276 nm. Nach Zusatz steigender Silbermengen zu einer 1%-igen PVA-Lsg. zeigte sich weder eine Extinktionsänderung noch eine Verschiebung des Absorptionsspektrums.

## 7.5 Silberadsorption an die Zellmasse von Testkeimen und deren Keimreduktion

### 7.5.1 Adsorption von Silberionen an Bakterien und Cand. albicans aus silberhaltigen Lösungen

Versuchsdurchführung 1:

Es sollte geprüft werden, inwieweit Silberionen aus der Lösung durch adsorptive Bindung an Mikroorganismen verloren gehen. Zu diesem Zweck wurden sowohl Silbernitratlösungen als auch Lösungen mit eingelegten Keramikringen, die mit geschmolzenem Silberchlorid überzogen waren, geprüft.

Prüfungsergebnisse: Tab. 30

Testkeime: E. coli ATCC 8739
Pseud. aer. ATCC 9027
Staph. aur. ATCC 6538
Cand. alb. ATCC 10231

Keimeinsaat: $10^7 - 10^8$ Keime/ml Prüflg.

Prüflösungen: 50,0 ml Isotonische $NaNO_3$ -Lösungen mit unterschiedlichem Silbergehalt.

Anzahl: 20

Nr. 1 1080 µg $Ag^+$ /l als $AgNO_3$
Nr. 2 110 " " " "
Nr. 3 550 " " " "
Nr. 4 500 " " " erstarrte AgCl-Schmelze auf Keramikringen
Nr. 5 500 " " " " " " " "

Die Prüflösungen wurden in Flaschen aus Jenaer-Glas aufbewahrt. Die Silberchloridringe wurden 1 Tag vor der Keimeinsaat in die Lösungen eingelegt. Der angegebene Silbergehalt von 500 µg/l ist ein geschätzter Mittelwert. Da der Silbergehalt wegen der Gefahr der Sekundärkontamination vor der Keimeinsaat im Prüf-

gefäßt nicht bestimmt werden konnte, wurde die Silberionenkonzentration von anderen in gleicher Weise behandelten Lösungen potentiometrisch gemessen. Dabei wurde in 3 verschiedenen Lösungen 1 Tag nach dem Einlegen der Keramikringe ein Gehalt von 400, 473 und 605 µg $Ag^+$ /l gefunden.
In jede der Prüflösungen Nr. 1 - 5 wurde eine wässrige Suspension der oben aufgeführten Testkeime inoculiert. Die Keime wurden durch mehrmaliges Waschen und Abzentrifugieren von Nährmediumresten befreit.
Nach 14 Tagen wurde der Silbergehalt potentiometrisch mit Hilfe einer ionenspezifischen Kristall-Membranelektrode (7.1) bestimmt. Danach wurde über ein naß eingelegtes Membranfilter aus Zellulosenitrat filtriert und der Silbergehalt im Filtrat bestimmt. Das Filter wurde mit 25 ml Wasser gewaschen, in eine Porzellanschale überführt und mit 1 ml $HNO_3$ 65% verascht. Von dem im Wasser aufgenommenen Rückstand wurde der Silbergehalt bestimmt.

Ergebnisse der Silberadsorption:

Wie aus den tabellarischen und graphischen Darstellungen auf S. 153 zu entnehmen ist, nahm der Gehalt an freien Silberionen im Prüfungszeitraum bei den $AgNO_3$-Lösungen 1 - 3 ab. Hier zeigte sich, daß Silberionen adsorptiv an Gefäßwand, Schwebstoffteilchen und an die Bakterienmasse gebunden werden. In den Lösungen 4 und 5 mit AgCl stieg die Silberionenkonzentration dagegen an, bedingt durch die sehr geringe Lösungsgeschwindigkeit der erstarrten Silberchloridschmelze. Bei den zahlreichen Messungen an nicht beimpften Lösungen wurde wiederholt gefunden, daß eine Sättigung erst nach mehreren Tagen erreicht wird.
Man erkennt hier also deutlich die Zunahme der $Ag^+$ -Ionenkonzentration in der Lösung bei Prüfgefäßen mit Silberdepots.

Die keimhaltige Prüflösung und das keimfreie Filtrat unterschieden sich nicht wesentlich in ihrem Silberionengehalt. Der Silbergehalt aus dem Membranfilterrückstand war sehr unterschiedlich. Auch wurde im Filtrat der Lösung 2 ein höheres Potential gemessen als in der keimhaltigen Lösung.

Eine Erklärung dafür ist in der Ungenauigkeit der Methode bei Silberionenkonzentrationen unter 50 µg/l zu suchen. Werte in diesem Konzentrationsbereich konnten nur noch annähernd mit Fehlern bis 20% gemessen werden. Ein anderer Grund liegt in der Störung der Potentialeinstellung in einer Lösung mit hohem Keimgehalt durch die während der Messung auftretenden Adsorptionseffekte und Komplexbindungen mit Proteinen, die sich besonders ausgeprägt bei niedrigem Silbergehalt zeigten.

Bei der Silberbestimmung im Filterrückstand wird vermutlich nicht nur die an die Bakterienoberfläche gebundene Silbermenge erfaßt, sondern auch beim Lagern ausgefallenes Silberkolloid, was an einer Braunfärbung des Membranfilters zu erkennen war. Die Silberreduktion ist als Folge der Lichtreaktion während der chemischen und mikrobiologischen Prüfungen zu sehen, da die Lösungen in hellen Flaschen aus Pyrex-Glas, unter Lichtschutz, gelagert wurden. Die beiden Werte über 100 µg/l bei den Lösungen 4 und 5 müssen unter diesem Aspekt gesehen werden. Vergleichende Prüfungen mit frischen $AgNO_3$-Lösungen zeigten keine Verluste in der Silberionenkonzentration durch Membranfiltration und ebenfalls keine sichtbaren Rückstände auf dem Filter, ebensowenig die Lösungen der Versuchsdurchführung 2.

Wenn man die Ergebnisse der nachfolgend beschriebenen Versuchsdurchführungen 2 und 3 von E. coli mit den oben aufgeführten zusammenfassend auswertet, kann man die Abnahme der Silberionenkonzentration durch Adsorption an Keime und auch Gefäßwände als nachgewiesen betrachten.

2. Ergebnisse der Keimreduktion (Abb. 25)

Trotz der hohen Keimeinsaat von $10^7$ - $10^8$ Keimen /ml war die Zahl der überlebenden Keime in 18 von 20 geprüften Lösungen nach 1 und 2 Wochen nicht größer als 0,1%. Dabei war die Höhe der $Ag^+$ - Ionenkonzentration in der Prüflösung, insbesondere bei E. coli und Pseud. aeruginosa für den Verlauf der Absterbekurven nicht relevant, ein Ergebnis, das bereits bei anderen Versuchen mit hohen Keimeinsaaten beobachtet wurde. Gegenüber Cand. alb. und Staph. aureus war eine schnelle Keimreduktion

zu beobachten, während in einigen Fällen bei E. coli und Pseud. aer. augenscheinlich die Silberwirksamkeit durch den hohen Proteingehalt der Bakterienmasse negativ beeinflußt wurde.

### 7.5.2 Adsorption von Silberionen aus $AgNO_3$-Lösungen an E. coli ATCC 8739

**Versuchsdurchführung 2**

Die Versuche wurden in gleicher Weise und mit gleicher Aufgabenstellung durchgeführt wie die zuvor beschriebenen.
Die Ergebnisse sind in der Tabelle 31 mit Histogramm dokumentiert.
Als Prüflösungen wurden ca. $10^{-5}$m $AgNO_3$ in isotonische $NaNO_3$-Lösung mit 1050 µg $Ag^+$ /l hergestellt, durch Sterilfiltration entkeimt und zu je 50 ml in Versuchsgläser aus Jenaer Glas abgefüllt. Davon wurden die Lösungen 1 und 2 mit ca. $10^8$ Keimen/ beimpft, Lösung 3 blieb unbeimpft.
Die Silberionenkonzentration der Prüflösung wurde potentiometrisch nach 5 h, 5 und 14 Tagen bestimmt. Nach 14 Tagen wurde der Silbergehalt im Filtrat sowie im Rückstand der Membranfiltration, wie bereits beschrieben, ermittelt.

**Ergebnis**

Bei einer Keimeinsaat von ca. $10^8$ Keimen/ ml E. coli wurden innerhalb von 14 Tagen 20 - 25% der freien Silberionen an die Bakterienmasse gebunden, bei einer Silberkonzentration von ca. 1000 µg $Ag^+$ /l zu Versuchsbeginn. Bei Lösung 1 nahm die Silberionenkonzentration zunächst ab und stieg danach wieder an. Eine Erklärung ist in der vielfach zitierten Reversibilität von Silber-Proteinkomplexen zu finden. Die Silberionenkonzentration in der unbeimpften Lösung blieb innerhalb von 5 Tagen unverändert.
In beiden Lösungen waren nach 14 Tagen keine Keime mehr nachweisbar.

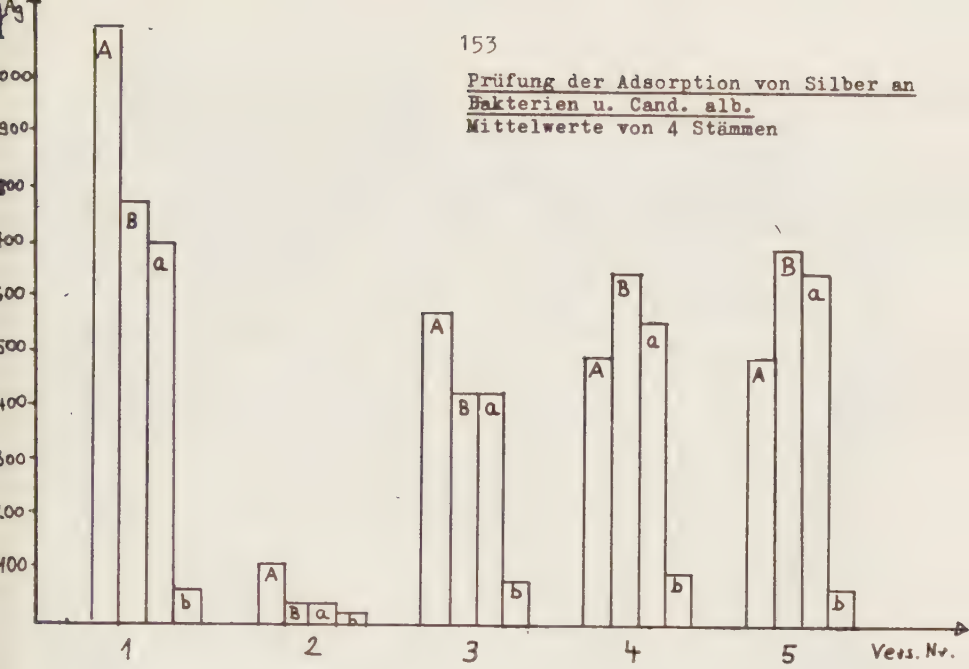
7.5.3 Keramikringe mit erstarrter Silberchloridschmelze überzogen: Adsorption von Silberionen durch E. coli ATCC 8739

Versuchsdurchführung 3

Die benannten Ringe wurden in die keimfreien Prüflösungen 1 - 8 der Tab. 32 gelegt. Der Anstieg der Silberionenkonzentration während der Lagerung sowie deren Abnahme nach der Keimeinsaat wurde komplexometrisch gemessen. Wie auch bei der Versuchsdurchführung 1 und in anderen Versuchen gefunden, nahm die von der Silberchlorid-Oberfläche abgegebenen Silbermenge innerhalb von 7 Tagen zu. An Borsäure und Natriumchloridlösung wurden auch hier wiederum weniger $Ag^+$ - Ionen abgegeben als an Wasser und Natriumnitratlösung. Nach 3 - 7 Tagen wurde als Testkeim E. coli in einer Höhe von $10^7$ - $10^8$ Keimen/ml Prüflösung inoculiert und erneut die Silberionenkonzentration nach 1 Tag sowie nach 18 Tagen bestimmt. Die Pfeile bezeichnen den Zeitpunkt der Keimeinsaat. Zur Bestimmung der Gesamtsilbermenge in der Lösung nach 3 Wochen wurde die Lösung mit Salpetersäure eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und die Silbermenge anschließend durch Titration mit Dithizonlösung komplexometrisch bestimmt. Wie zu ersehen ist, lag die Gesamtsilberkonzentration z.T. erheblich über der Silberionenkonzentration in der Lösung. Die Differenz muß also den Anteil des komplex gebundenen Silbers ausmachen.
Einen Tag nach der Keimeinsaat wurde jeweils eine wesentlich niedrigere Konzentration an freien Silberionen gefunden als vorher. Diese erste Abnahme der $Ag^+$ -Ionenkonzentration, die bei Lösungen $\geq$ 200 µg Ag/l besonders hoch war, ist nicht allein auf deren Adsorption an die Bakterienmembranen, sondern auf die Zurückdrängung von $Ag^+$ durch $Cl^-$ -Ionen, welche mit der Keimsuspension als Phosphat- NaCl - Lösung 0,3/15,0 bei der Keimeinsaat zugesetzt wurden, zurückzuführen. Für die weitere Abnahme der $Ag^+$ - Ionenkonzentration innerhalb von 18 Tagen ist wahrscheinlich der erwähnte Adsorptionseffekt verantwortlich zu machen.
Weiterhin ist aus den Versuchsergebnissen eine Proportionali-

tät zwischen der Höhe der anfangs in der Lösung vorhandenen und der durch Adsorption an die Bakterienmasse gebundenen Silbermenge zu entnehmen. Die prozentualen Silberionenverluste sind bei Silberionenkonzentration von ca. 500 µg $Ag^+$/l ~70% und bei Mengen unter 100 µg $Ag^+$ /l nicht meßbar gewesen. Da in den Prüflösungen mit höheren Chloridgehalt die Menge an freien Silberionen unterhalb der Erfassungsgrenze lag, konnte jeweils nur die Gesamtsilbermenge bestimmt werden.
In allen Prüflösungen war die Zahl der überlebenden Keime bereits nach einer Woche kleiner als 0,1%, was bei der hohen Keimeinsaat auf eine große Empfindlichkeit von E. coli gegenüber Silber und daher eine ausreichende mikrobizide Wirksamkeit der Ag Cl-Ringe, selbst bei einer extrem hohen Keimeinsaat von $10^7$ - $10^8$ Keimen /ml Prüflösung schließen läßt.

Prüfung der Adsorption von Silber an Bakterien u. Cand. alb.
Mittelwerte von 4 Stämmen




Histogramm: A = µg $Ag^+$/l: vor der Keimeinsaat
B = µg $Ag^+$/l: 2 Wochen nach Keimeinsaat
a = Filtrat nach 2 W
b = Membranfilterrück stand nach 2 Wo.

| Nr. | Tabelle: 30 | A | B | | a | | b | 4 Testkeime |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,1 m-$NaNO_3$ Lösungen mit | µg $Ag^+$/l vor der Keimeinsaat | mV Keimhaltige Lösung | µg $Ag^+$/l nach 2 Wochen | mV Filtrat | µg $Ag^+$/l Filtrat | µg $Ag^+$/l Membranfilterrückstand | ATCC-Stämme |
| 1 | $10^{-5}$m $Ag^+$ = 1080 µg $Ag^+$/l | 1080 | 296 | 715 | 294 | 682 | 29 | Pseud.aer |
| | | | 298 | 722 | 294 | 682 | 51 | Staph.aur. |
| | | | 300 | 825 | 295 | 715 | 94 | E.coli. |
| | | | 301 | 825 | | | | Cand.alb. |
| 2 | $10^{-6}$m $Ag^+$ = 110 µg $Ag^+$/l | 110 | 227 | 35 | 233 | 47 | 35 | Pseud.aer. |
| | | | 226 | 35 | 229 | 40 | 10 | Staph.aur. |
| | | | 239 | 60 | | | | E.coli. |
| 3 | $5.10^{-6}$m $Ag^+$ = 550 µg $Ag^+$/l | 550 | 281 | 374 | 281 | 374 | 72 | Pseud.aer. |
| | | | | | | | | Staph.aur. |
| | | | 281 | 374 | 281 | 374 | 77 | E.coli. |
| 4 | AgCl-Schmelze Keramikringe 500 µg $Ag^+$/l | 500 | 299 | 770 | 297 | 704 | 132 | Pseud.aer. |
| | | | 287 | 485 | 284 | 418 | 71 | Staph.aur. |
| | | | 294 | 682 | | | | E.coli. |
| | | | 295 | 660 | 290 | 550 | 99 | Cand.alb. |
| 5 | AgCl-Schmelze Keramikringe 500 µg $Ag^+$/l | 500 | 297 | 722 | 296 | 715 | 110 | Pseud.aer. |
| | | | 300 | 825 | 299 | 770 | 52 | Staph.aur. |
| | | | 297 | 722 | 297 | 722 | 52 | E.coli |
| | | | 282 | 484 | 285 | 440 | 77 | Cand.alb. |

## MIKROBIOLOGISCHER BELASTUNGSTEST nach USP XIX

**Testkeim:** ATCC-Keime **Keimeinsaat:** $10^7 - 10^8$ K/ml

**Prüflösung:** Nr. 1-5
Tab: 30

Versuche zur Prüfung der Adsorption von Silber an Bakterien und Cand. alb.

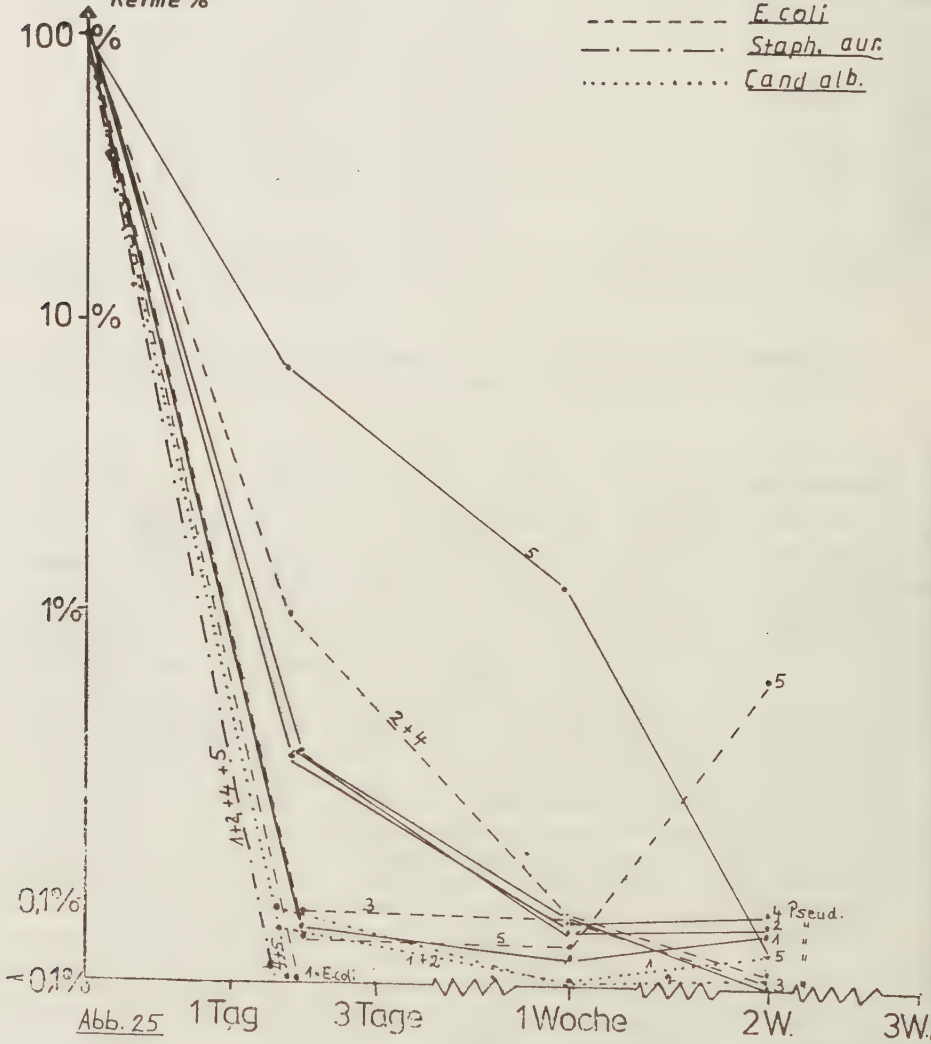



Abb. 25

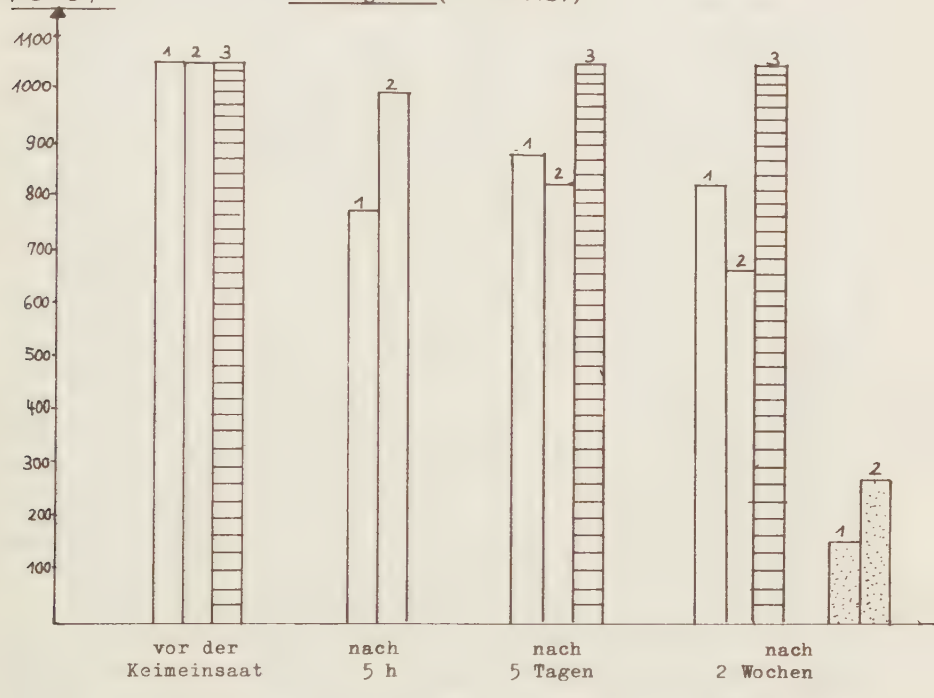
ADSORPTION VON SILBER AN DIE BAKTERIENOBERFLÄCHE ( E. coli ATCC 8739 )
-Silbernitratlösungen-

Silbergehalt: µg Ag (potentiometrisch)

| Nr. | Prüflösung 50 ml | Keim-einsaat | Silber-gehalt vor der Keimeins | Silbergehalt nach der Keimeinsaat in der Prüflg. nach 5 h | nach 5 Tg. | im Filtrat nach 2 | im M.F.-Rü. Wochen | rechne-risch: Gesamt |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $AgNO_3$ $10^{-5}$ m | $2.10^8$ K/ml | 1050 | 770 | 880 | 825 | 165 | 990 |
| 2 | $Ag^+$/ l in | $10^8$ K/ml | 1050 | 990 | 825 | 660 | 286 | 946 |
| 3 | $NaNO_3$-Lg. | — | 1050 | | 1050 | | | 1050 |

Tab.: 31 Gefäße aus Jenaer Glas

Histogramm (zu Tab.:31)




Vergleichslösung: nicht inoculiert Vers.-Nr. 3

Prüflösung: inoculiert Vers.-Nr. 1,2

M.F.-Rü.: adsorptiv an E.coli gebundene Silbermenge ( durch Membranfiltration abtrennbar)

KERAMIKRINGE: MIT ERSTARRTE SCHMELZE AUS SILBERCHLORID ÜBERZOGEN

a) Silberlöslichkeit in verschiedenen Prüflösungen

b) Silberlöslichkeit in denselben Prüflösungen nach hoher Keimeinsaat

c) Silbermenge, die von der Masse der Bakterien gebunden wird

| Vers. Nr. | Keramikringe AgCl in 15 ml Lg. | a) vor der Keimeinsaat: Lagerzeit | a) µg $Ag^+$/l | b) nach d. Keimeinsaat: Lagerzeit | b) µg $Ag^+$/l (µg Ag/l) | c) Silberverlust der Lg. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Wasser, dest. | 1 Tag<br>7 Tage | 270<br>512 → | 1 Tag<br>18 Tage | 210<br>116 | 59 %<br>77 % |
| 2 | Wasser, dest. | 3 Tage | 216 → | 1 Tag<br>18 Tage<br>21 Tage | 216<br>165<br>(528) | —<br>69 %<br>(Gesamtsilber) |
| 3 | Natrium-nitrat-Lg. 0,2 m | 1 Tag<br>7 Tage | 135<br>540 → | 1 Tag<br>18 Tage | 330<br>165 | 39 %<br>69 % |
| 4 | Natrium-nitrat-Lg. 0,2 m | 3 Tage | 202 → | 1 Tag<br>18 Tage<br>21 Tage | 165<br>66<br>(132) | 18 %<br>50 %<br>(Gesamtsilber) |
| 5 | Borsäure-Lösung 2 % | 1 Tag<br>7 Tage | < 40<br>~ 40 → | 1 Tag | < 40 | nicht bestimmbar |
| 6 | Borsäure-Lösung 2 % | 3 Tage | 67 → | 1 Tag<br>18 Tage | 67<br>50 | — |
| 7 | Borsäure-Lösung 2 % | 3 Tage | 101 → | 1 Tag<br>18 Tage<br>21 Tage | 95<br>82,5<br>(165) | 6 %<br>50 %<br>(Gesamtsilber) |
| 8 | Natrium-chlorid-Lg. 0,9 % | 3 Tage | ~(41) → | 1 Tag | (98) | |
| | | (Gesamtsilber bei allen NaCl-Lösungen) | | | | |

Methode: komplexometrisch mit Dithizon  Erfassungsgrenze: 40 µg $Ag^+$/l

Fehler: 5-10%  ( $Cl^-$ Ionen stören )

Gesamtsilber = (): Die Menge an ionisiert + gebunden vorliegendem Silber wird nach Eindampfen der Prüflösung mit $HNO_3$ erfasst.

Tab: 32

# 8 Zusammenfassung

## 8.1 Beziehung zwischen Keimreduktion und Silberionenkonzentration in der Lösung

Reaktionskinetische Untersuchungen für Silbersalze durchzuführen, im Sinne der Bestimmung eines Konzentrationsexponenten, lag nicht im Interesse dieser Arbeit.
Es galt lediglich zu prüfen, ob sich unter den Bedingungen eines Konservierungsmittelbelastungstests, mit mind. 99,9% Keimreduktion innerhalb einer Woche, eine therapeutische Breite für die Silberionenkonzentration in Augentropfen festlegen läßt. Unter Berücksichtigung der physiologisch-chemischen Kompatibilität sollte die Grenze nach oben mit ca. 1000 µg $Ag^+$ /l als maximale Konzentration angesetzt werden. Eine minimale Hemmkonzentration im angegebenen Sinn läßt sich für das gesamte Keimspektrum kaum festsetzen. Bei den Versuchen zur Prüfung der Silberempfindlichkeit (Kap. 6.2.1) ergaben sich für Silbernitratlösungen ohne weitere Zusätze Richtwerte von 30 - 50 µg $Ag^+$ /l (E. coli und Staph. aur.) bis zu 500 µg $Ag^+$ /l (Bac. subt.).
Nur in reinen wässrigen Silbersalzlösungen ohne Keimeinsaat ist die zugesetzte Silbermenge mit der in der Lösung vorhandenen Silberionenaktivität gleichzusetzen (bei $< 10^{-5}$ m/l). Wie aus den Untersuchungen (Kap. 6.2.1) zu ersehen ist, konnte die antimikrobielle Wirksamkeit annähernd als Reaktion 1. Ordnung betrachtet werden, wobei die Silberionenkonzentration in der Lösung bis zu einer gewissen Höhe als geschwindigkeitsbestimmender Schritt für den Keimtötungseffekt anzusehen war. Solche linearen Gesetzmäßigkeiten wurden für Silbernitratlösungen im Konzentrationsbereich von 50 - 1000 µg $Ag^+$ /l gefunden (7, 43, 82, 129). BRAUNE wies aber auf gewisse Regelabweichungen hin, indem er meinte, eine "Wirkungslücke" von Silberionen gegenüber E. coli bei 300 - 500 µg $Ag^+$ /l gefunden zu haben. Bei den eigenen Versuchen waren solche Unlinearitäten in der Keimreduktion ebenfalls wiederholt zu beobachten.

Wenn man rückschauend nochmals die Ausführungen unter Kap. 3 zum oligodynamischen Effekt von Schwermetallen betrachtet, unter besonderer Wichtung der Untersuchungen von MODAK und FOX (74) sowie JENSEN et al. (54), muß man annehmen, daß ein gewisser Überschuß von Silberionen in der Lösung notwendig ist, um das Reaktionsgleichgewicht zur Bildung von Silber-Nukleotid-Komplexen in diese Richtung zu verschieben. Wenn man zudem weiß, daß der Zelltod erst eintritt, wenn Silberatome in ausreichender Anzahl entlang der DNA-Doppelhelix über eine gewisse Zeit gebunden wurden - die Komplexe sind z.T. bei erhaltener Funktionsfähigkeit der DNA reversibel - und daß die Bindungskapazität gegenüber Silber gleichhoch bei abgetöteten wie auch vermehrungsfähigen Mikroorganismen ist, sollte man auch annehmen, daß mit Silber konkurrierende Adsorbentien die antimikrobielle Wirksamkeit einschränken können, weil sie die Reversibilität von Ag-DNA- und Ag-Proteinkomplexen begünstigen. In rein wässrigen Silbersalzlösungen sind derartige Komplexbildner denkbar als Schwebstoffe, Gefäßwände, Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen oder bereits abgetötete Mikroorganismen, die in Konkurrenz zu den noch lebenden Silber adsorbieren. In dieser Richtung müßten die Dosis-Wirkungsschwankungen in den Absterberaten gedeutet werden.[1]

Enthielten die Lösungen Komponenten, die chemisch einen limitierenden Einfluß auf die Silberionenaktivität ausübten, so mußte die Konzentration des gelösten Silbersalzes erhöht werden, um gleiche Keimtötungszeiten zu erreichen. Als derartige Substanzen erwiesen sich im Rahmen dieser Arbeit: Chlorid- und Phosphationen, insbesondere die Kombination von beiden, Methylcellulose und Proteine (als Pepton). Die Abnahme der Silberionenaktivität wurde bei diesen Substanzen potentiometrisch nachgewiesen.

In Lösungen mit "Silber-Depots" in Form von schwer löslichen Salzen machten sich diese Einflüsse weniger deutlich bemerkbar, d.h. eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Keimtötungseffekt und gemessener Silberionenkonzentration in der Lösung konnte nicht aufgestellt werden, zumindest nicht für die Zeitinter-

[1] Temperaturdifferenzen bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen sind mit zu berücksichtigen.

valle zwischen den Keimzahlbestimmungen von 1, 3 und 7 Tagen. Bei Vergleich der mikrobiologischen Prüfungen mit den gelösten Silbermengen der Tab. 25 - 29 muß angenommen werden, daß die antimikrobielle Wirksamkeit keinesfalls allein von der Höhe der Silberionenkonzentration abhängig gemacht werden kann, sondern ebenso von dem komplex gebundenen Silberanteil bestimmt werden muß. Andernfalls wäre, wie bereits erwähnt, Silber in allen chloridhaltigen Lösungen mit $Cl^-$-Konzentrationen von $> 10^{-4}$m unwirksam, da in solchen Lösungen die Silberionenkonzentration unterhalb der potentiometrischen Nachweisgrenze und des oligodynamischen Konzentrationsbereichs liegt. Dazu gehören alle Prüflösungen, denen die Keime aus einer NaCl-Phosphat-Pufferlösung inoculiert wurden, und das war die größere Anzahl der Prüfmuster. Bei parallelen Versuchen mit wässrigen Keimsuspensionen konnten keine Wirkungsunterschiede in den Absterberaten beobachtet werden.
Wie die Silberbestimmungen von AgCl-Ringen in NaCl-Lösungen ergaben, liegt der größte Silberanteil komplexiert vor. Die Dissoziation dieser Argentatkomplexe wird demnach zugunsten der Bildung von Silber-Proteinkomplexen mit höherer Komplexbildungskonstante gefördert. Mit den "Silberdepots" wurde also trotz geringer Silberionenkonzentration eine ausreichende Keimreduktion erzielt. Unsicher wurde die Wirkung in der Regel nur, wenn mehrere Komplexbildner in der Prüflösung anwesend waren, wie Chlorid + Phosphat, Chlorid + Methylcellulose oder Pepton + Chlorid und Phosphat.
Ungeklärt bleibt, in welchem Ausmaß die Stabilität der Silberkomplexe mit Methylcellulose für die Behinderung der antimikrobiellen Silberwirkung verantwortlich ist. Sicherlich hat im Fall Polyvinylpyrrolidon die Substrateigenschaft solcher hydrophilen Makromoleküle die größere Bedeutung für die bessere Überlebensfähigkeit der Keime.
Wie die Ausführungen unter Kap. 7.5 mit den Tabellen 30 - 32 und Abb. 25 zeigen, wurde Silber zu einem erheblichen Anteil aus der Lösung an die Zellmasse der Mikroorganismen gebunden. Die Geschwindigkeit der Keimreduktion war unabhängig von der adsorbierten Silbermenge und von der in der Lösung verbliebe-

nen Konzentration an freien Silberionen.
Wenn die Höhe der Gesamtsilberkonzentration in der Lösung mindestens 100 µg /l betrug, waren bei vegetativen Keimen sowie Prüfzeiten von mehreren Tagen keine wesentlichen Unterschiede mehr zwischen Keimreduktion und Silberionen- bzw. Gesamtsilberkonzentration festzustellen. Vielmehr wirkten sich wahrscheinlich bei sehr hoher Keimeinsaat von $> 10^7$ Keimen /ml geringfügige Erhöhungen des Keimgehaltes negativ auf die Belastbarkeit der Lösung aus, da die Silberionen unspezifisch sowohl an abgestorbene als auch an lebende Zellproteine gebunden werden. Die REM-Aufnahmen der Abb. 26 und 27 zeigen solche abgestorbenen Zellhaufen von E. coli mit starken Proteinhüllen, welche die Oberfläche der Silber-Depots besetzen.

Ich bin der Meinung, mit den Ausführungen in dieser Arbeit ausreichend Beweismaterial geliefert zu haben, um die in den meisten Puplikationen zur "Oligodynamie-Forschung" dargelegten Befunde, daß der antimikrobielle Effekt von Silber allein von der Silberionenkonzentration in der Lösung abhängt, zu entkräften. Die Vermutungen von WURMANN und einiger anderer Autoren, daß es auf eine gewisse minimale Konzentration und auf die Komposition der Lösung ankommt, wurden experimentell bestätigt.

## 8.2 Vergleich der geprüften Silberdepots auf ihre Eignung zur Konservierung von Augentropfen

Mit versilberten Pipetten aus Polypropylen (STELLA) wurden die erforderlichen Keimreduktionen am schnellsten und sichersten erreicht, danach folgen die mit erstarrter Schmelze aus AgCl überzogenen Ringe und porösen Steine. Bei AgCl-imprägnierten Fritten wurden zuweilen Unstetigkeiten im mikrobiologischen Belastungstest mit mangelhafter Keimtötungsgeschwindigkeit gefunden. Eine Erklärung für diese Befunde wurde bereits mit den chemisch-analytischen Untersuchungen im Kap. 7.3.3 gegeben, wo u.a. auf die schlechte Reproduzierbarkeit der Diffusion von Silberionen aus den Poren der Fritten hingewiesen wurde. Die aus den beiden erstgenannten Silberde-

pots in Lösung gebrachten Silbermengen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Eine bessere antimikrobielle Wirksamkeit der versilberteb Augentropfer wurde bei Gegenwart von viskositätserhöhenden Stoffen wie Methylcellulose und Polyvinylalkohol beobachtet.
Eine Erklärung läßt sich einerseits durch die im Kap. 3.7 dargelegten Ausführungen finden, wonach mit Silberoxid stabilere Proteinkomplexe gebildet werden als mit anderen Silbersalzen. Da auch Methylcellulose Silber komplex bindet, sollte in Gegenwart von $Ag_2O$ (Oberfläche der Plastiktropfer) eine Gleichgewichtsreaktion zugunsten der Silberproteinkomplexe anzunehmen sein.
Wichtiger erscheint mir eine vergleichende Betrachtung der Oberflächenstruktur von überzogenen Platiktropfern und Ringen an Hand der REM-Aufnahmen Abb. (26 - 31) zur Klärunge der Wirkungsunterschiede im mikrobiologischen Versuch zu sein.

1. Durch die nachträgliche Behandlung des Silberüberzuges der Plastiktropfer entstand eine große innere Oberfläche aus $Ag/ Ag_2O$ . Silberoberflächen weisen bekanntlich, je nach Darstellung, mannigfache Strukturen auf, mit meist abgerundeter bis kugelartiger Gestalt der Silberkristalle. Solche kugelförmigen Partikel kann man deutlich bei den Aufnahmen der überzogenen Plastikschicht entdecken (Abb. 26 und 27).
2. Aus den Aufnahmen der AgCl-Überzüge (Abb. 28 - 30) läßt sich ein gewisser Ordnungszustand ablesen, der sich beim Abkühlen der Schmelze ausgebildet haben muß. Die Oberfläche ist glatt, die Grenzlinien dürfen wegen ihrer Regelmäßigkeit keine Brüche sondern Korngrenzen von AgCl-Kristallen darstellen, die sich wie ihre Unterlage orientiert haben. Bei sehr langsamem Abkühlen einer AgCl-Schmelze von 400 $^{o}C$ soll man plastische Filme mit Einkristallen von sogar einigen mm - cm Länge erhalten können (33).
Es ist leicht einzusehen, daß die Lösungstension von $Ag^+$ aus solch einer glatten AgCl-Oberfläche nicht sehr groß sein kann. Ein ganz anderes Bild einer AgCl-Oberfläche, in gleicher Weise auf Keramikringe aufgebracht, zeigt die Abb 31 . Die innere Oberfläche ist weitaus größer und in ihrer Struktur mit der

$Ag/Ag_2O$-Schicht der Plastiktropfer vergleichbar. Die Aufnahme zeigt das Ergebnis einer Zersetzungserscheinung, die sich optisch durch Dunkelfärbung der Schicht zu erkennen gab. Die poröse Struktur entstand vermutlich durch die Nachbehandlung des AgCl-Überzugs mit $HNO_3$, wobei gebildetes Silber und Silberoxid zum Teil herausgelöst wurde.
Da die Aufnahmen erst nach Abschluß der mikrobiologischen Versuche entstanden, konnte nicht geklärt werden, ob durch Aufziehen der Schmelze und Nachbehandeln unter anderen definierten Bedingungen eine Optimierung der Silberlöslichkeit und mikrobiologischen Wirksamkeit möglich ist. Wahrscheinlich ist die Temperatur der Schmelze, die Abkühlzeit und die Lagerung der Formlinge für die Silberlöslichkeit von Bedeutung. Die genannten viskositätserhöhenden Substanzen verkleben wahrscheinlich die Oberfläche und blockieren dadurch die Silberabgabe an die Lösung. Ein derartiger Effekt könnte auch bei der geometrisch kleineren Oberfläche der AgCl-Ringe eher zum Tragen kommen.
Auf die Möglichkeit, durch Änderung der Handelsqualität und Reduktion der Substanzmenge bei Methylcellulose (Abb. 24, Tab. 10) bessere Ergebnisse zu erhalten, wird an dieser Stelle nochmals hingewiesen.
Wie die Versuche zu dieser Arbeit insgesamt zeigen, sind beide Silberdepots zur Konservierung von Augentropfen geeignet, vorteilhafter jedoch, wenn sie austauschweise für verschiedene Formulierungen eingesetzt werden. Soweit sich übersehen läßt, sind die silberbeschichteten Plastiktropfer besser für Lösungen mit makromolekularen Hilfsstoffen geeignet, die AgCl-Ringe oder Formlinge besser für Lösungen, die mit NaCl isotonisiert wurden. Wie erwähnt, mußte in einigen Testflaschen mit NaCl-Lösung eine schlechte Haftung des Silberüberzuges festgestellt werden.

## 8.3 Eignung von Silber in ppb-Mengen - in Form von schwer löslichen Verbindungen - zur Konservierung wässriger Augenarzneien aus mikrobiologischer Sicht

Ist nun die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber, wenn es

aus den beschriebenen Depot-Formen in ppb-Mengen in Lösung gebracht wird, sicher genug, um in wässrigen Ophthalmica den erforderlichen Schutz vor Rekontamination zu bieten?
Als "erforderlich" wird angesehen, daß zumindest die Ergebnisse der nach USP XIX-Richtlinien durchgeführten Konservierungsmittelbelastungstests die dort geforderte mikrobizide Wirksamkeit gegenüber Bakterien und mikrobistatische gegenüber Pilzen nachweisen. Darüber hinaus sollten die Prüfungsergebnisse in der Regel auch in den durch die strengeren Anforderungen der Interpharma-Arbeitsgruppe Mikrobiologie gesetzten Rahmen passen. Als besonders begrüßenswert wird es angesehen, wenn dieses Ziel auch bei Prüfungen mit einem erweiterten Keimspektrum erreicht wird.
Die bereits dargelegten experimentellen Beweise dürften ausreichen, um die Frage grundsätzlich zu bejahen.
Diese sind:
1. Die antimikrobielle Wirksamkeit wurde bei einer großen Anzahl von Augentropfen und deren Trägerflüssigkeiten mit Erfolg getestet. Die Palette der geprüften Wirk- und Hilfsstoffe wurde so variabel wie möglich gestaltet. Durch Literaturstudium erhaltene Hinweise auf störende Einflüsse physikalischer und chemischer Art wurden besonders beachtet, wie: Variation in der Lagertemperatur der Testflaschen, pH-Wert der Lösung, Substrateigenschaft und Komplexbildung bei Hilfsstoffen.
2. Das Spektrum der Prüfkeime wurde erweitert. Außer den ATCC-Stämmen der USP XIX-Prüfkeime wurden 16 weitere Stämme und 3 andere Keimarten, darunter 2 Sporenbildner in die Prüfungen einbezogen. Die Höhe der Keimeinsaat wurde häufig über den vorgeschriebenen Bereich hinaus auf $> 10^6$ Keime /ml Prüflösung erweitert, wobei trotzdem ausreichende Keimreduktion erzielt wurde.
3. Die Voraussetzungen und Bedingungen für die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber im ppb-Bereich wurde durch chemisch-analytische Untersuchungen an Lösungen mit schwer- und leicht löslichen Silbersalzen geklärt.

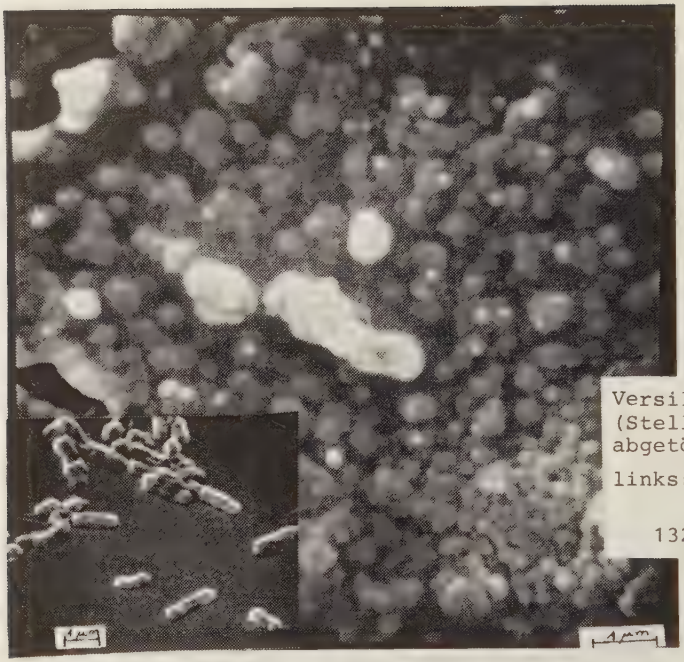
Der Wirksamkeitsnachweis von den präparierten Testflaschen gegenüber Mikroorganismen ist nach meiner Auffassung durch die Breite der Versuchsplanung und die vorstehend beschriebenen Ergebnisse erbracht worden.
Besonders hervorzuheben ist die zuverlässigere Keimreduktion durch die "Silber-Depots" gegenüber den leicht löslichen Silbersalzen wie $AgNO_3$ . Als Beispiel sei hier lediglich die Keimreduktion gegenüber Bacillus subtilis im Suspensionstest der Tab. 2 aufgeführt. Vollständige Keimreduktion wurde erst mit 1000 µg $Ag^+$ /l erreicht, während der Keim gleichfalls in den Testflaschen mit "Silberdepot-Einlagen" abgetötet wurde, die in der Regel geringere Silbermengen an die Lösung abgeben.

Einflüsse des pH-Wertes (bei pH 4,5 - 8) auf die Absterberate nach 1 Woche waren innerhalb dieser Zeit nicht erkennbar. Bei niedrigen pH-Werten wird wahrscheinlich die nach Literaturangaben schlechtere Silberwirksamkeit durch die geringere Überlebensfähigkeit von Bakterien in aciden Lösungen kompensiert.

Bei einer Reihe von DAC-Formulierungen, insbesondere bei vielen Lösungen, die mit Borsäure isotonisiert wurden, zeigte sich eine Autosterilität gegenüber den ATCC-Stämmen, so daß bei zusätzlicher Silberung in jedem Fall ausreichend Schutz vor Rekontamination geboten sein dürfte.
In eigenen Untersuchungen mit 18 und 14 Testpersonen wurde die Kontamination nach 4-wöchigem Gebrauch von nicht konservierten sowie gesilberten Augentropfen geprüft. Gemeinsam Mit BARKMAN wird vermutet, daß die Gefahr der Rekontamination während eines nur 4-wöchigen Gebrauchs bei geeignetem Abgabegefäß nicht sehr hoch ist, so daß auch von dieser Seite her ein vernünftiger Kompromiß mit der Verwendung der "Silber-Depots" geschlossen werden kann, wenn man die Vorteile eines wesentlich günstigeren therapeutischen Index gegenüber den gebräuchlichen Konservierungsmitteln in Betracht zieht.
Die Keime des erweiterten Testkeimspektrums waren ausreichend silberempfindlich, um nach einer Woche in der Regel um mindestens 99,9% reduziert zu werden, mit Ausnahme von Aspergillus. Bei diesem Keim wurde lediglich eine Keimvermehrung

innerhalb des Prüfungszeitraumes verhindert.
Eine Reihenfolge der Silberempfindlichkeit der meist benutzten Testkeime kann annähernd angegeben werden:
E. coli > Staph. aur.> Pseud. aer.> Cand. alb.> Bac. subt.> Asp.

Abschließend bleibt zu erwähnen, daß die Verwendung von Silberdepots in den Gefäßen von Aufbewahrungsflüssigkeiten für Kontaktlinsen von Interesse wäre, da sich auf diese Weise die Folgen der durch Konservierungsmittelabsorption auftretende Unverträglichkeitserscheinungen umgehen ließen. Daher müßte zuerst nachgewiesen werden, in welcher Höhe Silber selbst in den Linsen gespeichert wird um eine Verfärbung des Kunststoffmaterials der zur Zeit gebräuchlichen "weichen" und "harten" Linsen induziert. Falls sich herausstellt, daß nur unbedeutende Mengen gespeichert werden, sollte wegen der Vorteile aus pharmakologischer Sicht dem Einsatz von oligodynamischen Silbermengen auch für diesen Arzneiformenbereich kein Einhalt geboten werden.

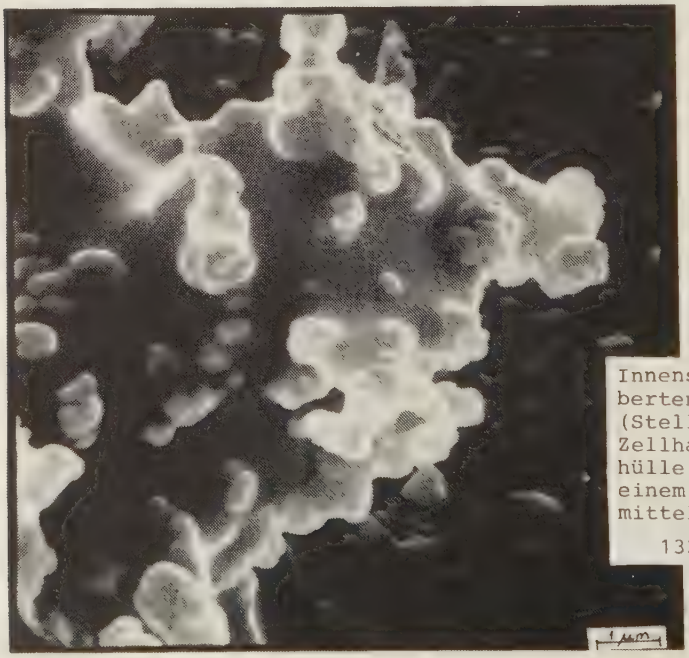


Versilberte Augentropfer (Stella). Innenseite mit abgetöteten Keimen E.col

links: E.coli lebende Keime

13200-fach

Abb. 26



Innenseite eines versil berten Augentropfers (Stella). Abgetöteter Zellhaufen mit Protein-hülle von E.coli nach einem Konservierungs-mittelbelastungstest

13200-fach

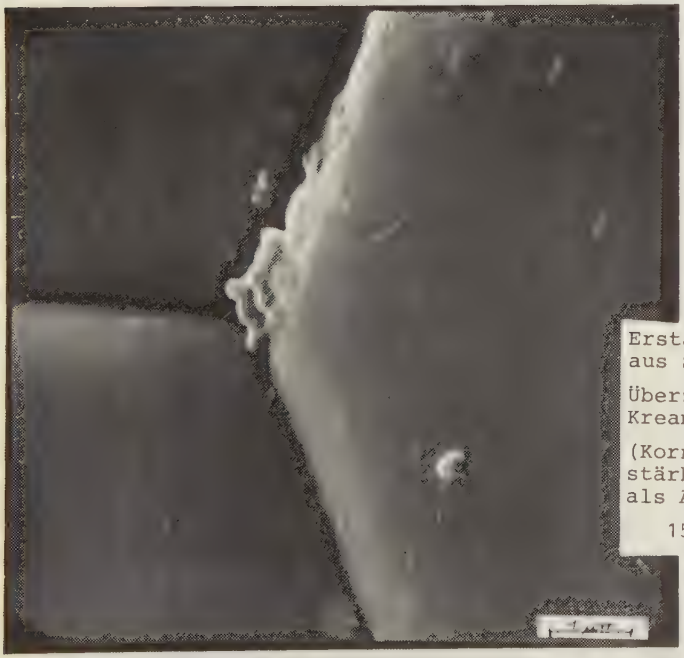
Abb. 27

Erstarrte Schmelze aus Silberchlorid

Überzug eines Keramikringes

1560-fach

Abb. 28



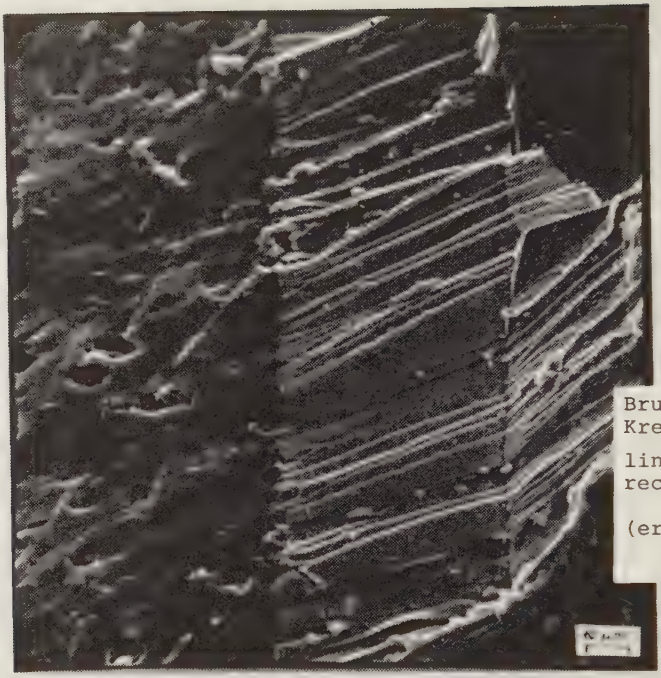
Erstarrte Schmelze aus Silberchlorid

Überzug eines Kreamikringes

(Korngrenzen, stärker vergrößert als Abb. 28)

15600-fach

Abb. 29

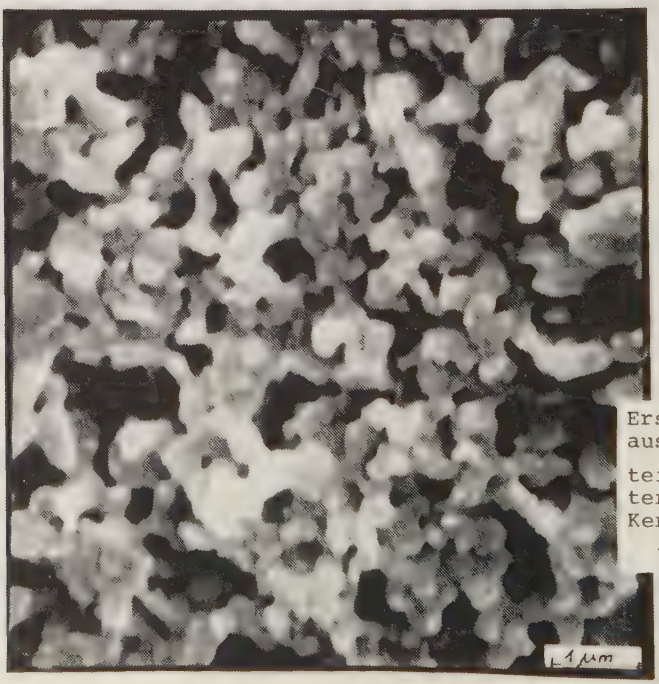


Bruchstücke eines Kreamikringes

links: ohne Überzug
rechts: mit Silber chlorid (erstarrte Schmelze)

780-fach

Abb. 30




Erstarrte Schmelze, aus Silberchlorid,

teilweise zersetzter Überzug eines Keramikringes

15600-fach

Abb. 31

9 Literaturverzeichnis


1. ABDOU, M.F.A., In Pharmazeutika unerwünschte Mikroorganismen
1. Pseud. aer.: Bedeutung, Vorkommen, Nachweis und Bekämpfung
Pharm. Ind. 35, 857-65 (1973)

2. ALTHAUS, H., Trinkwasserversilberung in kleinen Landgemeinden. (Elektrosilberung)
Arch. Hyg. 154, 574-76 (1971)

3. ANDERSON, R.A., and STOCK, B.H., The bactericidal effect of some ophthalmic vehicles
Austr. J. of Pharm. 39, 1110-12 (1958)

4. ANDERSON, R.A., The bactericidal effect of some ophthalmic vehicles
III catiom active preservatives against Pseud. aer.
Austr. J. of Pharm. 46, 525-27 (1965)

5. ANDERSON, K., et.al., Efficacy of bacteriostats in ophthalmic solutions
The Pharm. Journal 593-94 (1964)

6. BARBEROT, R., et al., Contribution à l' étude d'un test de contrôle microbiologique de la conservation de certaines formes galeniques (sirops, gouttes, ougment)
1. u. 2. Mitteilung
1. Act. Ph. Helvetica 39, 556 (1964)
2. Act. Ph. Helvetica 40, 229 (1965)

6 a BARKMANN, R., GERMANIS, M., et al., Preservatives in eye drops
Acta Ophthalmol. 47, 461-75 (1969)

7. BRAUNE, J.F., KRUSCHE, F., KURTH, C., LIPPELT, H., WORATZ, H., THOFERN, E., Die Trinkwassersilberung, Grundlagen und Ergebnisse
R. Oldenburg, München 1957

8. BROWN, M.R.W. and ANDERSON, A., The bactericidal effect of silver ions on Pseud. aer.
J. of Pharm. and Pharmacol., 20, Suppl., 1-3 (1968)

9. CAMMAN, K., Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden
Springer Verlag 1973

1o. CASON, J.S., JACKSON, D.M. et al., Antiseptic and aseptic prophylaxis of burns:
Use of silver nitrate and of isolators
British Medical J., 2, 1288-94 (1966)

11. CARSON, L.A. FAVERO, MS.et al., Factors affecting comperative resistance of naturally occuring and subcultured Pseud. aer. to disinfectants Appl. Microbiology 23, 863-69 (1972)

11 a CAVALLI-SFORTA, L., Biometrie, Verl. G. Fischer 4. Aufl. (1974)

12. BÜHLMANN, X. GAY, M. et al. Biologische Reinheit von Arzneimitteln. Richtlinien und Methoden für eine Pharmacopoe Acta Pharm. Helv. 46, 321-470 (1971)

13. CHAMBERS, C.W., PROCTER, C.M. KABLER, P.W. Bactericidal effect of low concentrations of silver J. of A.W.W.A. 54, 209-216 (1962)

14. CLEGG MÜLLER, D., WEST, P.W. MÜLLER, R.H. Determination of silver ion in parts per billion with a selective ion electrode Anal. chem. 41, 2038-40 (1969)

15. DACHS, E., Was leistet das Katadyn-Verfahren heute bei der Entkeimung des Wassers Getränke-Industrie 17, 3-9 (1963)

16. DAVIES, G.E., FRANCIS, J., et al. "Hibitane". Laboratory investigations of a new antibacterial agent of high potency Brit. J. of Pharmacology 9, 192-96 (1954)

17. DAVIES, M., Rabbit eye irritation from bactericides in soft lens soaking solutions J. of Pharm., Pharmacol. 25, 134 p. (1973)

18. DAVIS, J.G., Methods for evalution of the antibacterial activity of surface active compounds: Technical aspects of the problem J. Appl. Bact. 23 (2), 318-344 (1960)

19. DETTNER, H.W. ELZE, J. Handbuch der Galvanotechnik Carl Hanser Verlag München 1969

20. Deutsches Einheitsverfahren zur Wasse untersuchung: Bestimmung des Silberions

21. EBEL, S., Experimentelle Einführung in die Potentiometrie
Verlag Chemie 1975

22. DUST, R.A. and DUHART, B.T., Ion-selective electrode study of trace silver ion adsorption on selected surfaces
Anal. chem. 42, 1002-4 (1970)

23. EICHBAUM, F., Die Wertbestimmung "oligodynamischer" Silberwässer im biologischen Versuch
Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 126, 128 (1932)

24. ELKHOULY, A.E. and YOUSELF, R.T. "Antibacterial efficiency of mercurials"
J. Pharm. Sci. 63, 681-85 (1974)

25. ERMERS, H. Probleme der Flachglasversilberung
Glaswelt 22, 24-28, 64-68, 112-116, 179-182, (1969)

26. ENDLER, F.H., Silber-Spritzverfahren
Glaswelt 22, 312-16 (1969)

27. FIP Die Anforderungen der neuen Arzneibücher an Augenarzneimitteln
DAZ 115, 1401-1410 (1975)

28. FDA Sterilität von Augenarzneien
Federal Register 37, 23406 (1972)

29. FISCHER, H., LEOPOLDI, G., ULSER, A., Quantitative Bestimmung kleiner Silbermengen mit Dithizon
Z. Anal. Chemie 101, 1-23 (1935)

30. FORSTER, J.H.G., Preservation of ophthalmic solutions Part 1 (Pseud. aer.)
Manufactoring chemist and aerosol news 36, 45-50 (1965)

31. FROMHERZ, H., WEISS, J., Zur Kenntnis der oligodynamischen Wirkung des Silbers
Ang. Chemie 50, 679-681, (1937)

32. GASSET, A.R. ISHII, J., Cytotoxicity of chlorhexidine
Canad. J. Ophthalm. 98-100 (1975)

33. GMELIN Handbuch der anorg. Chemie
Element, Silber, Bd. 1, Bd. 3, Bd. 6
Springer Verlag 1975, System Nr. 61

34. GOODMAN, L.S./ GILMAN, A. — The Pharmacological Basis of Therapeutics 5th Ed.., Maximillan Publ. New York

35. GOTTSCHALK, H. — Eine einfache Standardmethode für olig. Versuche mit Silber Zbl. Bakt. I.O., 122, 400-03 (1931)

36. GOTTSCHALK, H., — Über die Beeinflussung der oligodyn. Wirkung Zbl. Bakt., I.O., 123, 468 (1932)

37. GRABOWSKI, B.F. HANEY, W.G. — Characterisation of silver-deposits in tissue, resulting from derma-application of a silver containing pharmacentical J. of Pharm. Scienc. 61, 1488-89 (1972)

38. GREGOR, D.R., ELLIKER, P.R., — A comparison of some properties of stains of Pseud. aer. sensitive and resistant to quaternary comp. Can. J. Micribiologie 4, 499-503 (1958)

39. GRUMBACH, A., — Zum Wirkungsmechanismus einiger Schwermetalle II Mitteilung: Silberionen III " : Cu-Salze Schw. Zeitschrift f. Pathol. u. Bakt 11, 504-512 (1948); 12, 97-112 (1949

4o. HÄDDI ADNAU — Untersuchungen zur Konservierung von Augentropfen Diss. Uni Hamburg (F. Neuwald) 1968 Math. nat. Fakultät

41. HALLMANN, L., BURKHARDT, F., — Klinische Mikrobiologie 4. Aufl. 1974 G. Thieme Verlag, Stuttgart

42. HAMACHER, H., — Augenarzneien, mikrobiologische und biopharm. Aspekte Pharmazie in Zeit Nr. 3, S. 77 (1976

43. HERRMANN, A., — Beiträge zur Frage der Oligodynamie Diss. ETH Zürich 1934

44. HERRMANN, G., — Zur chemischen (stromlosen) Metallabscheidung Galvanotechnik 65, 462-68 (1974)

45. HEYMANN, K., WOLDT, G., et al. — Metallisieren von Kunststoffen Galvanotechnik 62, 4 (1971)

46. HEYMANN, K., WOLDT, G., et al. — Beizaktivierung, die dritte Generation des Kunststoffgalvanisierens Galvanotechnik 61, (3), 1970

47. HÖLTJE, H.D., — Molekularer Wirkungsmechanismus einiger Antibiotica Pharmazie in unserer Zeit, 5, 161-69 (1976)

48. HORN, PRIVORA, WEIFFEN, — Handbuch der Desinfektion und Sterilisation Bd I, Grundlagen der Desinf. VEB-Berlin 1972

49. HOWLE, J.A., GALE, G.R., SMITH, A.B., — Biochem. Pharmac. 21, 1465 (1972)

50. HOWORKA, K.B., MEYER, R., — Unverträglichkeiten mit Thiomersal Pharmazie 28, 136-37 (1973)

51. HUGO, W.B., FORSTER, J.H.S., — Bactericidal effect upon Pseud. aerug. of chemical agents for use in ophthalmic solutions J. Pharm. Pharmacol. 16, Suppl, 124T-126T (1964)

52. IKEDA, Sh., — Beiträge zum Studium der oligodynamischen Silberwirkung Zbl. Bakt., I.O. 136, 269 (1936)

53. IWANOWITSCH, G. — Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro- und Spurenanalyse Verlag Chemie 1958

54. JENSEN, R.H./ DAVIDSON, N. — Spectrophotometric, potentiometric and density Gradient ultracentrifugation studies of the binding of silver ion by DNA Biopolymers 4, 17-32, (1966)

55. JUST, J., SZNIOLOS, A., — Germicidal properties of silver in water J.A.W.W.A. 28, 493-506 (1934)

56. KEIPERT, S.,/ VOIGT, R. et al. — Wechselwirkungen zwischen makromolekularen Hilfsstoffen und Arzneistoffen Pharmazie 28, 145-183 (1973)

57. KLIEWE, H./ STEYSKAL, K., Über Chemismus und bakteriologische Wirkung von Schwermetallaerosolen
Z. Hyg. un Inf. 127, 110-122 (1947/48)

58. KOHN, S.R., GERSHENFELD, L., BARR, M. Effectiviness of antibacterial agents presently employed in ophthalmic preparations as preservatives against Pseud. aerug.
J. of Pharm. Sci., 52, 967-74 (1963)

59. KRÜGER, D., Die Kontrolle der Hygiene und mikrobiol. Qualität bei der Herstellung v. Arzneimitteln
Pharm. Ind. 39, 807-14 (1977)

60. KRÜGER, D., ZIMMERMANN, G., Untersuchungsgang bei der bakteriologischen Prüfung von nicht sterilen A.M. sowie Wirk- und Hilfsstoffe auf Keimzahl und Keimart
Pharm.Ind. 37, Nr. 5 (1975)

61. KRÜGER, D., Mikrobielle Reinheit von Arzneimitteln
Pharm. Zeit. 119, 2021-29 (1974)

62. KUL'SKII, L.A., MOROZ, O.G., et al. Change ultrastructur of E.oli communal under the effect of a silver electrolytic solution Dopr.Akad. Nauk UKV. RSR,
Ser. B 36 (9), 836-9 (1974)

63. LEITNER, N., Einfluß von Elektrolyten auf die bakterizide Wirkung von Kupfer und Silber, Erklärung der Salzhemmung
Bioch. Zeitschrift 221, 42 (1930)

64. LEITNER, N., Zur Phänomenologie der olig. Wirkung - Die Salzhemmung -
Zbl. Bakt., I.O. 112, 368-75 (1929)

65. LEITNER, N., Oligodynamie - eine Metallionenwirkung
Klin. Wochenschrift 8, 1952 (1929)

66. LENZ, G.R., MARTELL, A.E., Metall chelates of some sulfur-containing amino acids
Biochemistry 3, Nr. 6, 745-50 (1964)

67. LIEB, F., Über die Verwendung der ODW des Silbers in der Hygiene des Wassers Archiv f. Hyg. u. Bakt. 119, 92-111 (1938)

68. LIEB, F., Ein Beitrag zur Säureaktivierung des metallischen Silbers Arch. Hyg. u. Bakt. 116, 317 (1936)

69. LINGNAU, J., Möglichkeiten der Konservierung pharmazeutischer Zubereitungen Pharm. Ind., 32, 266-271 (1970)

7o. LINGNAU, J., Die Konservierung flüssiger und halbfester Arzneizubereitungen aus der Sicht des Mikrobiologen APW. Acta Pharm. Techn. 23, (1) 1977

71. LIST, P.H., Beherrschung der mikrobiologischen Qualität von Arzneien Pharm. in unserer Zeit 4, 97-107 (1973)

72. MERCK Mikrobiolgisches Handbuch

73. Methrom EA 306-S/Ag Ionenspezifische Elektrode Gebrauchsanweisung

74. SHANTA, M., MODAK, K., FOX, Ch., Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of Pseud. aerug. Biochem. Pharm. 22, 2392-2404 (1973)

75. MONAFO, W.W. et al. Use of silver-nitrate solutions in maintance of air hygiene in a burns unit The Lancet 303-304 (1966)

76. MULLEN, W., SHEPHERD, W., LABORITZ, J., Opthalmic preservatives and vehicles Survey of ophthalmology 17, 469-83 (1973) Baltimore

77. LEITZ, M., Cirtique of the USP Microbiological Test Bulletin par. drug ass. 26, 212-27 (1972)

78. NEISSER, M., EICHBAUM, F., Die oligodynamische Metallwirkung in Theorie und Praxis Arg. Hyg. 3, 170 - 23 (1932)

79. NIEDERPRÜM, H., Chemische Vernickelung
Angew. Chemie 87, 652-58, (1975)

80. NORTON, D.A., DAVIES, D.J.G., et al. The antimikrobial efficiencies of contact lens solutions
J. pharm., pharmacol. 26, 841 (1974)

81. NÜRNBERG, E., Technologie der Konservierungsmittel
Acta pharm. Techn. 23, (2), 111, (1977)

82. OBERZILL, W., Zur Frage der oligodynamischen Silberwirkung und ihrer Anwendung auf die Entkeimung von Trink- und Mineralwasser
Scient. pharm. 24, 171-93 (1956)

83. OBERZILL, W., Erfahrungen mit "Mikropur" bei der Sanierung von Brunnen nach Verunreinigung durch Hochwasser
Ztschr. f. Hyg. Bd. 143, 62-80 (1956)

84. OBERZILL, W., Experimentelle Grundlagen zur Trinkwasserversilberung
Archiv f. Hyg. u. Bakt. 141 Nr. 3, (1957)

85. Ophthalmica Bd1, APV
WVG Stuttgart 1975

86. ORION, Silver ion mesurements using the sulfid specific ion electrodes
Applications Bulletin Nr. 3

87. PATZWALDT, H.G., et al. Die keimtötende Wirkung von Thiomersal in Impfstoffen
Pharm. 27, 603-5 (1972)

88. PFANKUCH, E., HAGENGUTH, K., Polarographische Untersuchungen über die Bindung von Schwermetallen an Proteine und Virusproteine
Biochem. Z. 313, 1-10 (1942)

89. PAULI, W., MATULA, J., Untersuchungen über die physikalischen Zustandsänderungen der Kolloide: über Silbersalzproteine
Biochem. Z. 80, 187-210 (1917)

90. PRICE, W.R., Operating room, care of burned patients
American Journal of Nursing, 68, 1705-7 (1968)

91. REYBROUCK, G., A theoretical approach disinfectant testing
Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B-160, 342-367, 1975

92. WERNER, H.P., REYBROUCK, G., WERNER, G., Ein Vergleich der Ergebnisse von vier nationalen Methoden zur Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln in zwei Laboratorien
Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B-160, 368-391, 1975

93. REYBROUCK, G., WERNER, H.P., Vergleichende Untersuchung von vier nationalen Methoden zur Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln in zwei Laboratorien
Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B-160, 392-411, 1975

94. RICHARDSON, N.E., MEAKIN, B.J. The interaction of preservatives with polyhema
J. of Pharm., Pharmacol. 27, 26 p, (1975)

95. RICHARDSON, N.E., DAVIES, D.J.G. et al. The preservative content of contact lens solutions on storage
J. pharm. pharmacol. 27, 27 p (1975)

96. RICHARDS, R.M.E., Mc BRIDE R.J., Enhancement of benzalkoniumchlorid and chlorhexidinacetat activitiy against Pseud. aerug. by aromatic alcohols
J. Pharm. Sci. 62, 2035-37 (1973)

97. RICHARDS, R.M.E., Mc BRIDE, R.J. Cross-Resistance in Pseud. aerug. resistant to phenylethanol
J. Pharm. Sci. 61, 1075-76 (1972)

98. RICHARDS, R.M.E., Mc BRIDE, R.J., The preservation of ophthalmic solutions with antibacterial combinations
J. Pharm. Pharmacol. 24, 145-48 (1972)

99. RICHARDS, R.M.E., Inactivation of restitant Pseud. aerug. by antibacterial combinations
J. of Pharm. Pharmacol. 23, 136S-140S (1971)

1oo. RIEGELMANN, S., VAUGHAN, D.G., J.Am. Pharm.Ass.pract. 19, 464, 537, 665, (1958)

1o1. RDZOK, E.J. GRUNDY, W.E. et al. Determinating the efficany of preservatives in pharmaceutical products J.Am. Pharm. Ass. Sci. Ed. 44, 613-16 1955

1o2. ROMANS, I.B., Oligodynamic metals in: Desinfection, Sterilization and Preservation (1968) Lea and Febiger, Philadelphia, S. 372-400

1o3. SCHRÖTER, E., WEUFFEN, W., Zur bakteriostatischen Wirksamkeit von ß-Aminoketonen Pharmazie 31, 314-16, Heft 5 (1976)

1o4. SCHRÖDER, H., Glas Email, Keramo-Technik 14, 161-68 (1963)

1o5. SHIPE, E.L., FIELDS, A., A comparison of the molekular filtration technique with agar plate counting for enumeration of E. coli. in various aqueous concentrations of Zinc and Coppersulfats Appl. Microb.2, 382-84 (1954)

1o6. SOEHRING, K., KLINGMÜLLER, O., NEUWALD, F., Untersuchungen über die Reizwirkung von in wässrigen Augenarzneien üblichen Zusätzen, insbesondere Konservierungsmittel Arz. Forsch. 9, 349-51 (1959)

1o7. SPEGG, H., Probleme der Bereitung von Augentropfen nach DAC DAZ 116, 1939-44 (1976)

1o8. SPEISER, P., Wissenschaftliche Anforderungen an sterile Präparate Pharm. Acta Helv. 48, 63 (1973)

1o9. STRUEMPLER, A.W., Adsorption characteristics of silver, lead cadmium, zinc and nickel on borosilicate glass polyetylene and polypropylene container surfaces Anal. chem. 45, 2251-2254 (1973)

| | | |
|---|---|---|
| 11o. | THROMB, Th.F.J., NUSMAN-SCHOTERMANN HUIZINGA, T., | De conservering van ooddruppels I/II<br>Pharm. Weekbl. 110 22, 465-73 (1975)<br>Pharm. Weekbl. 110 23, 485-92 (1975) |
| 111. | TOPLEY WILSON'S | Principles of Bakteriologie and Immunity<br>Vol I 6th Ed.<br>Verlag Edward Arnold, London |
| 112. | TRACY, R.L., | Factors controlling the germicidal activity of oligodynamic silver<br>J. of Bact. 41, 33-34 (1941) |
| 113. | ULLMANN, E., | Herstellung von flüssigen Augenarzneien im Rezepturmaßstab unter besonderer Berücksichtigung ihrer mikrobiellen Reinheit<br>Ph. Zt. 121, 1037-46 (1976) |
| 114. | ULLMANN, E., | Die Verfügbarkeit von Konservierungsmitteln in Arzneizubereitungen<br>Acta Pharm. Techn. 23 (2), 137-151 (1977) |
| 115. | ULLMANN'S | Enzyklopädie Bd 11<br>Kunststoffversilberung |
| 116. | URBAN, S., | Mikrobiologischer Belastungstest bei flüssigen Arzneiformen<br>Acta Pharm. Technol. 22 (4), 247-53 (1976) |
| 117. | USP XIX | Microbiological Tests |
| 118. | WALLHÄUSER, K.H., | Prüfung auf ausreichende Konservierung bei Arzneimitteln<br>Arztl. Lab. 16, 305-316 (1970) |
| 119. | WALLHÄUSER, K.H., | Sterilisation, Desinfektion und Konservierung<br>G. Thieme Verlag, 1967 |
| 12o. | WHO | Technical Report Series Nr. 148<br>Bericht 22, Anhang 2<br>Deutsche Übersetzung in Pharm. Ind. 32, 813 1970 |
| 121. | WEST, F.K., WEST, P.W., IDDINGS, F.A., | Adsorption of traces of Silver on container surfaces<br>Anal. chem. 38, 1566-70 (1966) |

122. WICHROWSKA, B., Comparative determination of silver in water by colorimetric methods Roczniki Panstwowego Zarkladu higieny 22, 561-70 (1971)

123. WIEDEMANN, B., MÖLLER, H., Prüfung der Konservierung von Augentropfen Ph. Zt. 121, 903-910 (1976)

124. WOLDT, G., Metallabscheidung ohne äußere Stromquelle
1. Jahrbuch Oberflächentechnik 30, 187-93 (1974)
2. Jahrbuch Oberflächentechnik 28, 198-201 (1972)

125. WOODWARD, R.L., Review of the bactericidal effectiviness of silver J. of the American Waterworks Ass. 55, 881-86 (1963)

126. WORATZ THOFERN Beitrag zum Wirkungsmechanismus der Oligodynamie Zbl. Bakt. I.O. 163, 538-42 (1955)

127. WORATZ THOFERN Versuche über den Mechanismus der Oligodynamie des Silbers in Braune, J.H. Die Trinkwassersilberung R. Oldenburg, München 1957

128. WORATZ THOFERN Beitrag zum Wirkungsmechanismus der Oligodynamie Zbl. Bakt. I. Orig. 163, 538 (1955)

129. WURRMANN, K., ZOBRIST, F., Untersuchungen über die bakterizide Wirkung des Silbers im Wasser Schweiz. Z. f. Hydrologie 20, 218-254 (1958)

130. YUDKIN, J., The effect of silver ions on some enzymes of bacterium coli Enzymologica 2, 161-69 (1937/38)

131. ZIMMERMANN, W., Oligodynamische Silberwirkung I Z. f. Hyg. Inf. 135, 403-413 (1952)

132. ZIMMERMANN, W., Oligodynamische Silberwirkung II Z. f. Hyg. Inf. 135, 414-20 (1952)

133. ZIMMERMANN, W., Der derzeitige Stand der Frage der oligodynamischen Silberwirkung
Inaug. Diss. (1939)
Friedrich Wilhelm Universität Breslau

134. ZIMMERMANN, W., Wasserentseuchung durch oligodynamische Silberwirkung
Zbl. Bakt. Orig. 160, 70-73 (1953)

## Lebenslauf

| | |
|---|---|
| 24.12.1940 | geboren in Breslau, als Tochter des Bauingenieurs Werner Jaekel und seiner Ehefrau Ellen, geb. Kudruss |
| 1947 - 1951 | Besuch der Grundschule in Uelzen |
| 1951 - 1960 | Besuch des Lessing-Gymnasiums in Uelzen |
| Februar 1960 | Reifeprüfung |
| April 1960 | Beginn der Praktikantenzeit in der Adler-Apotheke in Uelzen |
| März 1962 | Pharmazeutisches Vorexamen in Lüneburg |
| 1962 - 1965 | Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg |
| April 1965 | Pharmazeutisches Staatsexamen |
| 1965 - 1969 | Tätigkeit in verschiedenen öffentlichen Apotheken und in einer Krankenhausapotheke in Uelzen, München, Bad-Kreuznach als Kandidatin und Apothekerin |
| ab Oktober 1969 | Fachlehrkraft an der Staatlichen Lehranstalt für Pharmazeutisch-technische Assistenten in Trier |
| September 1975 | Beginn der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. P.H. List |

---

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Böhme, Dimroth, Drawert, Eiden, Kating, List, Mahr, Sander, Schiff, Siegert, Siess, von Stosch, Walcher, Wichtl.